



TITLE:

ARR1による多様な機能を有する遺伝子群への直接的な転写制御(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

谷口, 雅俊

CITATION:

谷口, 雅俊. ARR1による多様な機能を有する遺伝子群への直接的な転写制御. 京都大学, 2007, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2007-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k12867>

RIGHT:

新制
理
1470

ARR1 による多様な機能を有する遺伝子群への 直接的な転写制御

谷口 雅俊

2007

ARR1 による多様な機能を有する遺伝子群への
直接的な転写制御

谷口 雅俊

2007

目次

目次.....	1
要旨.....	3
第一章 序論.....	4
1. センサーヒスチジinkinナーゼ（サイトカニン受容体）.....	4
2. HPt (AHP)	7
3. レスポンスレギュレーター (ARR)	8
3-1. タイプ A ARR.....	9
3-2. タイプ B ARR.....	9
4. His-Asp リン酸リレー系によるサイトカニン応答と様々なシグナルとのクロス トーク	10
5. サイトカニン応答と遺伝子発現.....	11
第二章 材料および方法.....	18
1. 植物の生育条件	18
2. 植物体の薬剤付加処理.....	18
3. 植物体からのノザンブロットティング用 total RNA の抽出.....	18
4. ノザンブロットティング解析	19
4-1. total RNA の電気泳動およびメンブレンへの転写.....	19
4-2. ハイブリダイゼーション用プローブのクローニングおよびプローブの放射能 ラベル.....	19
4-3. RNA プロットハイブリダイゼーション	20
5. HiCEP 解析.....	20
6. プロモーター配列の抽出.....	22
7. ゲルシフトアッセイ	22
7-1. 大腸菌による組換えタンパク質の発現およびストックタンパク質溶液の作製	22
7-2. ゲルシフト用プローブの作製と放射ラベル	23
7-3. タンパク質と DNA の結合、電気泳動および検出	23
8. DNaseI フットプリント.....	24
8-1. プローブのクローニングおよびプローブの放射能ラベル	24
8-2. DNaseI フットプリントに用いたタンパク質の精製.....	24
8-3. タンパク質と DNA の結合および DNaseI 処理.....	25
8-4. 電気泳動および検出.....	26
9. マイクロアレイ解析	26
第三章 結果.....	31

1. ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子同定のための戦略	31
2. ARR1 によるタイプ A <i>ARR</i> 遺伝子の転写活性化	32
3. ARR1 によるタイプ A <i>ARR</i> 遺伝子以外のサイトカニン応答遺伝子の転写活性化	32
4. HiCEP 解析による新たな ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子の探索	34
5. ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーターに含まれる ARR1 の <i>in vitro</i> 結合配列の近傍配列の解析	35
6. <i>ARR6</i> 遺伝子のプロモーターに対する ARR1 の DNA 結合ドメインの結合様式の解析	36
第四章 考察	66
1. ARR1 によるダイレクトターゲット遺伝子の転写制御	66
2. HiCEP 解析による ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のスクリーニング	68
3. ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーター解析	69
4. <i>ARR6</i> 遺伝子のプロモーターに対する ARR1 の DNA 結合ドメインの結合様式の解析	70
本研究の結論と今後の展望	70
謝辞	78
参考文献	79

要旨

サイトカイニンとは植物細胞の分化・増殖を介して、植物個体レベルにおける様々な現象を制御する植物ホルモンである。モデル植物シロイヌナズナにおいてサイトカイニンシグナル伝達の初期過程は、サイトカイニン受容体ヒスチジンキナーゼから ARR1 を含むタイプ B レスポンスレギュレーターへの His-Asp リン酸リレーとよばれるリン酸基の受け渡しを介して行われている。ARR1 は転写因子であり、サイトカイニンシグナルによる初発応答遺伝子の転写を正に制御している。植物はこのようなシグナル伝達経路を介してサイトカイニンに応答し、様々な遺伝子の発現パターンを変化させると考えられている。しかし、ARR1 を含むタイプ B レスポンスレギュレーターのダイレクトターゲット遺伝子群の全体像が明らかでないため、植物個体レベルにおけるサイトカイニン応答現象へとつながるシグナル伝達経路の全容は未だ把握されていない。そこで、ARR1 によって直接転写活性化されるサイトカイニン初発応答遺伝子群を同定するため、グルコシルチコイドの付加により ARR1 の転写活性化能を誘導できる *35S-ARR1ADDK-GR* 形質転換シロイヌナズナを用いて ARR1 のダイレクトターゲット遺伝子を探索した。まず初めに、これまでに報告のあるサイトカイニン応答遺伝子群を調べた結果、サイトカイニン初発応答遺伝子のほとんどを ARR1 が転写活性化できることがわかった。また、*ARR1* 遺伝子欠損型変異体である *arr1-1* を用いた遺伝子発現解析により、それらダイレクトターゲット遺伝子のサイトカイニン初発応答における ARR1 の寄与については、その程度がそれぞれの遺伝子によって異なることがわかった。このことは、ARR1 以外のタイプ B レスポンスレギュレーターもこれらの遺伝子を転写活性化できることを示唆している。次に、High Coverage Expression Profiling (HiCEP) 解析により *35S-ARR1ADDK-GR* 形質転換植物における ARR1 転写活性化能誘導時と非誘導時の遺伝子発現を比較することで、さらなる ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子を同定した。このようにして同定された 23 の ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子には、タイプ A レスポンスレギュレーター、サイトカイニン代謝酵素、転写因子、病害抵抗応答タンパク質など様々な機能をもつタンパク質をコードするものが含まれていた。これらの結果は、His-Asp リン酸リレーが多様な機能をもつ ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子群の転写活性化を通して植物個体レベルにおける様々なサイトカイニン応答現象の制御に関わっていることを示している。また、ARR1 とそのパラログであるタイプ B レスポンスレギュレーターがサイトカイニン初発応答における遺伝子転写活性化のほとんどを行っていることが示唆された。

第一章 序論

植物ホルモンであるサイトカイニンは 1955 年に Miller らによって、別種の植物ホルモンであるオーキシシンと共に加えるとタバコの培養細胞の増殖を促進する物質として初めて発見された(Miller et al., 1955)。ここで利用されたサイトカイニンは、「kinetin」と名付けられた人工のアデニン誘導体であった。その後トウモロコシの内胚乳からサイトカイニン活性をもつ物質「zeatin」が同定された(Miller, 1961)。今日では、サイトカイニンとして高等植物に天然に存在する *trans*-zeatin や N⁶-(2-isopentenyl) adenine (2iP)と人工的に作られた kinetin、6-benzylamino purin (BA)、thidiazuron などが知られており、アラビドプシスの組織内には *trans*-zeatin がもっとも多く存在している(序論-図 1)。

サイトカイニンのホルモンとしての働きで最も知られている事象は、オーキシシンと協調して細胞分裂および細胞分化を制御していることである。一般的に植物の組織培養では、オーキシシンに対してサイトカイニンの割合を高くすると芽を生じ、オーキシシンに対してサイトカイニンの割合を低くすると根を生じる。一方、植物個体においてサイトカイニンは、頂芽優性の制御、側芽の形成、葉の展開、老化の遅延、道管細胞の形成、クロロプラストの増殖など植物体の発達において重要な役割を果たしている(Fosket, 1994; Mok, 1994; Reski, 1994; Buchaman et al., 2000; Oka et al., 2002)。近年、モデル植物シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を用いて、サイトカイニン受容から細胞内シグナル伝達に至る経路に関する研究が飛躍的に進展している。シロイヌナズナの細胞内でのサイトカイニンシグナル伝達は、原核生物で保存されている His-Asp リン酸リレー系で行われている。原核生物の His-Asp リン酸リレー系は一般的にはセンサーヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーターから構成されており、そのシグナルの伝達は保存された His 残基から Asp 残基へのリン酸基の転移により行われている。これは、一段階のリン酸基転移によるシグナル伝達であるが、多段階のリン酸転移を必要とする場合もある(序論-図 2)。それは、ハイブリッド型センサーヒスチジンキナーゼと HPt (His-containing phosphotransfer) を含むものである。ハイブリッド型センサーヒスチジンキナーゼはトランスミッタードメイン以外にレシーバードメインの構造をもち、HPt はトランスミッタードメインのみの構造をもつ。シロイヌナズナのサイトカイニンシグナルは、後者の多段階のリン酸転移を伴う His-Asp リン酸リレー系で伝達されている(Aoyama and Oka, 2003; Heyl and Schmulling, 2003; Kakimoto, 2003; Ferreira and Kieber, 2005; Mizuno, 2005)。

1. センサーヒスチジンキナーゼ (サイトカイニン受容体)

シロイヌナズナのサイトカイニンシグナル研究が飛躍的に進化したのは、1996 年のシロイヌナズナにおけるサイトカイニン受容体候補 *CKI1* (*cytokinin independent 1*) 遺伝子の発見以降である。*CKI1* はアクチベーションタギング法によりサイトカイニン非存在下においてカルスの緑化が起こる変異体より同定された(Kakimoto, 1996)。*CKI* 遺伝子を過剰発現させた場合サイトカイニン非依存的に典型的なサイトカイニン応答を行うことが示され、サイトカイニン受容体としての機能が示唆された(Kakimoto, 1996; Hwang and Sheen, 2001)。*CKI1* 遺伝子にコードされているタンパク質の構造は、原核生物に保存されている His-Asp リン酸リレー制御系の構成因子であるセンサーヒスチジンキナーゼと類似していることから、サイトカイニンシグナルと His-Asp リン酸リレー制御系との関連性が指摘され(Kakimoto, 1996)、後の研究の方向付けに大きく貢献した。しかし、大腸菌を用いた研究において *CKI1* はサイトカイニンに依存せず恒常的に His-Asp リン酸リレー系を活性化することが示されており(Yamada et al., 2001)、*CKI1* は現在においてもサイトカイニン受容体として認知されていない。シロイヌナズナにおいて *CKI1* は、そのトランスポゾン挿入変異体の解析と発現部位の解析から、雌性配偶子形成に機能していることが示されている(Hejatko et al., 2003)。

2000 年にシロイヌナズナにおいて異常な根を形成する *WOL* (*wooden leg*) 変異体に関する研究が報告された(Mahonen et al., 2000)。この *WOL* 変異の原因遺伝子は His-Asp リン酸リレー制御機構のセンサーヒスチジンキナーゼをコードしていることが明らかとされていたが、当時サイトカイニンとの関連は示唆されていなかった(Mahonen et al., 2000)。その 1 年後である 2001 年に鍵となる 3 つの報告がなされた。1 つの論文では、シロイヌナズナの組織培養系を用いてサイトカイニンに対する感受性が低下した変異体の原因遺伝子 *CRE1* (*CYTOKININ RESPONSE 1*) を(Inoue et al., 2001)、他の 2 つではシロイヌナズナ EST ライブラリーの *in silico* スクリーニングで得られた *AHK4* (*arabidopsis histidine kinase 4*) 遺伝子を報告している(Suzuki et al., 2001; Ueguchi et al., 2001a)。(*CRE1* 遺伝子および *AHK4* 遺伝子は *WOL* 遺伝子と全く同一の遺伝子であり、以降 *AHK4/CRE1/WOL* 遺伝子と表記)。シロイヌナズナの *AHK4/CRE1/WOL* 遺伝子への T-DNA 挿入による機能欠損変異体の研究において、サイトカイニン感受性が低下することが確認された(Ueguchi et al., 2001b)。また、酵母や大腸菌のセンサーヒスチジンキナーゼ欠損変異体への *AHK4/CRE1/WOL* 遺伝子の導入によりサイトカイニン依存的に酵母細胞内のシグナル伝達を制御することが出来ることが示された(Inoue et al., 2001; Suzuki et al., 2001)。さらにシロイヌナズナのプロトプラストを用いた *AHK4/CRE1/WOL* 遺伝子の一過的発現実験において、サイトカイニン特異的にサイトカイニン初発応答遺伝子の発現が上昇することが確認された(Hwang and Sheen, 2001)。これらの研究は、*AHK4/CRE1/WOL* がサイトカイニン受容体であることを裏付けている。

サイトカイニン受容体はシロイヌナズナに *AHK2*、*AHK3*、*AHK4/CRE1/WOL* の計

3つが存在する(Ueguchi et al., 2001a)。そのタンパク質構造は3つの受容体で共通しており、膜貫通領域を両端に持つ細胞外ドメイン、トランスミッタードメイン、レシーバードメインから構成されている(Inoue et al., 2001; Ueguchi et al., 2001a、序論-図3)。サイトカイニンが結合する細胞外ドメインは250アミノ酸程度で構成されており、CHASE (cyclase/histidine-kinase-associated sensory extracellular) ドメインと名付けられた一群のドメイン構造と類似性をもっている(Anantharaman and Aravind, 2001; Mougel and Zhulin, 2001)。このドメインのアミノ酸配列を原核生物や真核生物のセンサーヒスチジンキナーゼのものと比較したところ1次構造における共通性は非常に低い、2次構造においては高い類似性が確認された。このことから植物と他の生物のCHASEドメインによる低分子の認識に共通性があることが示唆された(Anantharaman and Aravind, 2001; Mougel and Zhulin, 2001)。また、3次構造予測により、このCHASEドメインが構成するポケットにサイトカイニンが結合することが予測されている(Pas et al., 2004)。このことは、*wol*変異体の表現型がCHASEドメインに存在する273番目のThr残基のIle残基への置換によってサイトカイニン結合に影響を及ぼした結果であることを構造面から支持している(Pas et al., 2004)。実際にサイトカイニン受容体とサイトカイニンの結合特異性も示されている。*AHK4/CRE1/WOL*遺伝子を発現させた分裂酵母の膜画分を用いた場合、サイトカイニンとしての高い生理作用を持つ isopentenyladenine、*trans*-zeatin、benzyladenine (BA)、thidiazuron と高い結合活性を示したが、サイトカイニンとしての生理作用が低い isopentenyladenosine では結合活性が確認されなかった(Yamada et al., 2001)。また、大腸菌に発現させた *AHK4/CRE1/WOL* と *AHK3* において、リン酸リレー活性のサイトカイニン特異性があることも示されている(Romanov et al., 2006)。

シロイヌナズナにおけるサイトカイニン受容体の T-DNA 挿入多重変異体を用いた機能解析や発現解析により、*AHK2*、*AHK3*、*AHK4/CRE1/WOL* がサイトカイニン正の制御因子であり、それらの機能が重複していることが示された(Higuchi et al., 2004; Nishimura et al., 2004)。驚くべきことに、三重変異体ではサイトカイニン感受性はなくなっているものの、成長点の分裂活性の低下による芽や根の形成に欠陥を生じるのみであり致死ではなかった(Higuchi et al., 2004; Nishimura et al., 2004)。サイトカイニンによる根の伸長阻害は、*AHK4/CRE1/WOL* の単一変異体で強く抑制されるが、*AHK2* や *AHK3* の単一変異体もしくは *AHK2* と *AHK3* の二重変異体では影響がない(Higuchi et al., 2004; Nishimura et al., 2004)。それとは逆に、*AHK2* と *AHK3* の二重変異体では葉の縮小化や花茎の矮化を伴い野生型よりも小さな植物体を生じるが、*AHK2* と *AHK4/CRE1/WOL* もしくは *AHK3* と *AHK4/CRE1/WOL* の二重変異体では野生型と同様な形態を示した(Nishimura et al., 2004)。以上の表現型の違いはこれらの遺伝子の発現パターンに起因しており、*AHK2* や *AHK3* が芽で、*AHK4/CRE1/WOL* は根で主な機能を示していると考えられる。しかし、三重変異体はどの組合せの二重変異体より

も根やシュートでより強い表現型を示す。このことは3つの受容体がそれぞれ主に働く部位はあるが、お互いに重複した機能を芽と根の両方で持っていることを示している。(Higuchi et al., 2004; Nishimura et al., 2004)

2. HPt (AHP)

シロイヌナズナの HPt である AHP (*Arabidopsis histidine-containing phosphotransfer protein*) は *in silico*での EST ライブラリーの探索により発見され、*AHP1*から*AHP5*までの5つの遺伝子が存在する(Miyata et al., 1998; Suzuki et al., 1998; Suzuki et al., 2000)。これら AHP 遺伝子がコードするタンパク質は共通して His 残基を含む150アミノ酸からなるドメインを有する(序論・図3)。AHP 遺伝子が His-Asp リン酸リレー系におけるリン酸伝達能を有することがシロイヌナズナ以外の生物を用いた相補実験や、*in vitro* 実験により示されている。酵母の浸透圧シグナル伝達は His-Asp リン酸リレー系で構成されており、His 受容体キナーゼである Sln1、HPt タンパク質である Ypd1、レスポンスレギュレーターである Ssk1 の順番でリン酸基の受け渡しが行われている。そのリン酸リレーに必須の *Ypd1* 遺伝子の欠損変異体に *AHP1* 遺伝子を発現させることによって Ypd1 欠損による表現型を復帰することが示されている(Suzuki et al., 1998)。また、*in vitro*において AHP タンパク質は大腸菌の膜画分の His キナーゼからリン酸基を受け取り、シロイヌナズナのタイプ A およびタイプ B のレスポンスレギュレーター(後述する)にリン酸基を転移させることが示され、そのリン酸基転移の様相は AHP と ARR の組み合わせにより様々である(Imamura et al., 1999; Imamura et al., 2001; Imamura et al., 2003; Tanaka et al., 2004)。大腸菌における *AHK4/CRE1/WOL* 遺伝子の導入実験により、*AHK4/CRE1/WOL* から直接大腸菌の His-Asp リン酸リレー系にシグナル伝達できるが、*AHP2* 遺伝子を導入することによりそのシグナル伝達を競合阻害できることが示されている(Suzuki et al., 2002)。このようなリン酸転移に関する事象のみでなく、酵母 two-hybrid 解析によって AHP とシロイヌナズナのセンサーキナーゼや、レスポンスレギュレーターとの特異的相互作用が明らかとなっている(Imamura et al., 1999; Urao et al., 2000; Lohrmann et al., 2001; Dortay et al., 2006)。

AHP のサイトカイニン応答への関わりは様々な点で観察されている。AHP タンパク質は主に細胞質に局在することが示されている(Imamura et al., 2001; Tantikanjana et al., 2004)。しかし、シロイヌナズナの培養細胞やプロトプラストにおいて、サイトカイニン処理依存的に核に局在することも示されている(Hwang and Sheen, 2001; Yamada et al., 2004)。シロイヌナズナの *AHP2* 遺伝子の過剰発現体は、サイトカイニンによる根や胚軸の伸長抑制実験において若干敏感になる傾向がみられた(Suzuki et

al., 2002)。しかし、プロトプラストを用いた *AHP1*、*AHP2*、*AHP5* 遺伝子の過剰発現において、サイトカイニン初発応答遺伝子の発現はみられない(Hwang and Sheen, 2001)。最近、*AHP* 遺伝子への T-DNA 挿入による単一変異から五重変異まで様々な組合せで変異体解析が行われた(Hutchison et al., 2006)。その研究では、すべての *AHP* 遺伝子の単一変異体でサイトカイニン応答に影響はみられないが、*AHP1*、*AHP2*、*AHP3* の変異体である *ahp1,2,3* においては、野生型に比べてサイトカイニンによる根の伸長抑制、側根形成の抑制、幼苗におけるクロロフィルの量の減少などが低下していることが観察された(Hutchison et al., 2006)。また、*AHP1*、*AHP2*、*AHP3*、*AHP4*、*AHP5* の変異体である *ahp1,2,3,4,5* においては、サイトカイニンによる胚軸の伸長抑制が *ahp1,2,3* よりさらに低下していた(Hutchison et al., 2006)。これらのことから、5 つの *AHP* 遺伝子がそれぞれ重複してサイトカイニン応答の正の制御因子として働いていることが示された(Hutchison et al., 2006)。しかし、一部のサイトカイニン応答に関して *AHP4* が負の制御因子として働くことも同時に示されている(Hutchison et al., 2006)。

3. レスポンスレギュレーター (ARR)

シロイヌナズナのレスポンスレギュレーター (ARR (arabidopsis response regulator)) の発見は、ほぼ同時期に 3 つのグループから報告されている。1 つは、シロイヌナズナのサイトカイニン処理によって黄化した幼苗で誘導される遺伝子として *ARR4* と *ARR5* が同定された報告である(Brandstatter and Kieber, 1998)。あと 2 つは、原核生物のレスポンスレギュレーターを鋳型にした *in silico* での EST データベースのスクリーニングにより *ARR1* と *ARR2* が同定された報告(Sakai et al., 1998)および *ARR3*、*ARR4*、*ARR5*、*ARR6*、*ARR7* が同定された報告(Imamura et al., 1998)である。実際にシロイヌナズナには、22 個の *ARR* 遺伝子が存在することが分かっている(Hutchison and Kieber, 2002)。それらは、コードするタンパク質のアミノ酸配列やドメイン構造の類似性により、タイプ A とタイプ B の 2 つのサブタイプに分類される(Imamura et al., 1999)。10 個の *ARR* はタイプ A に分類され (*ARR3*、*ARR4*、*ARR5*、*ARR6*、*ARR7*、*ARR8*、*ARR9*、*ARR15*、*ARR16*、*ARR17*)、それらは His-Asp リン酸リレー系におけるリン酸基の受容に関わるレシーバードメインのみで構成されている (序論-図 3)。また、11 個の *ARR* はタイプ B に分類され (*ARR1*、*ARR2*、*ARR10*、*ARR11*、*ARR12*、*ARR13*、*ARR14*、*ARR18*、*ARR19*、*ARR20*、*ARR21*)、それらはレシーバードメイン、DNA 結合に関わる GARP ドメイン、カルボキシル末端の付加的な配列で構成されている (序論-図 3)。

3-1. タイプ A ARR

タイプ A の ARR 遺伝子は、その mRNA 量がサイトカイニン付加によって短時間で上昇する (Brandstatter and Kieber, 1998; Taniguchi et al., 1998; D'Agostino et al., 2000)。それらは、サイトカイニンとともにタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを付加した実験により、サイトカイニン初発応答遺伝子であることも示されている (Brandstatter and Kieber, 1998; D'Agostino et al., 2000)。タイプ A ARR が機能構造として有するレシーバードメインは、His-Asp リン酸リレー系において AHP からのリン酸基を受け取ることが示されている (Imamura et al., 1999)。

シロイヌナズナのプロトプラストにおけるタイプ A *ARR* 遺伝子の一過的過剰発現により、サイトカイニン付加による *ARR6* 遺伝子のプロモーター融合 LUC レポーター遺伝子の発現が抑制された (Hwang and Sheen, 2001)。また、*ARR15* 遺伝子を過剰発現するシロイヌナズナでは、サイトカイニン感受が低下する (Kiba et al., 2003)。また、タイプ A *ARR* 遺伝子の T-DNA 挿入変異体を多数同定し、それらの組み合わせにより二重から六重 (*ARR3*, *ARR4*, *ARR5*, *ARR6*, *ARR8*, *ARR9*) までの変異体のサイトカイニン感受性について報告された (To et al., 2004)。野生型植物体と比べて、単一変異はサイトカイニン応答に顕著な変化が見られないものの、多重変異体、特に六重変異体においては根の伸長阻害、側根誘導、葉の黄化実験においてサイトカイニンに過敏になっていた (To et al., 2004)。これらのことは、タイプ A の ARR は、サイトカイニンの負の制御因子であり、機能的に重複していることを示している。

3-2. タイプ B ARR

タイプ A とは異なり、タイプ B の *ARR* 遺伝子はサイトカイニンによって転写が誘導されない (Imamura et al., 1999; Kiba et al., 1999)。タイプ B ARR は、その構造から転写因子として機能していることが考えられ、核局在することが示された (Sakai et al., 2000; Hwang and Sheen, 2001; Imamura et al., 2001)。また、*ARR1* の DNA 結合に関わる GARP ドメインは (Riechmann et al., 2000)、*in vitro* において特異的に (G/A)GAT(T/C) に結合し (Sakai et al., 2000)、*ARR1* や *ARR2* のカルボキシル末端の配列は転写活性化能をもつ (Sakai et al., 2000)。タバコの葉に *ARR1* 遺伝子または *ARR2* 遺伝子を一過的に発現した場合のその転写活性化能と比較して、レシーバードメインを欠損させた *ARR1* 遺伝子 (*ARR1ADDK*) または同様な *ARR2* 遺伝子 (*ARR2ADDK*) を導入した場合、高い転写活性化能を示した (Sakai et al., 2000)。また、シロイヌナズナのプロトプラストを用いた一過的発現系において、*ARR2* のレシーバードメインのリ

ン酸基受容に必須な Asp 残基を Asn 残基に置換した場合、サイトカイニン付加に依存した *ARR6* 遺伝子のプロモータ活性を誘導できない(Hwang and Sheen, 2001)。これらのことは、レシーバードメインが ARR1 や ARR2 の転写活性化能を負に制御していることを示唆している(Sakai et al., 2000; Hwang and Sheen, 2001)。さらに、ARR1ΔDDK にグルココルチコイド受容体のホルモン結合ドメインを融合した *ARR1ΔDDK::GR* 遺伝子をもつ形質転換シロイヌナズナが作製されている。この形質転換体では、グルココルチコイド付加により人為的に ARR1ΔDDK の転写活性化能が誘導された。即ち、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドの存在下においても *ARR6* 遺伝子の発現を上昇させることができた。また、*ARR1* 遺伝子の T-DNA 挿入機能欠損型変異体 (*arr1-1*) では、サイトカイニン付加による *ARR6* 遺伝子の発現誘導が野生型植物よりも低下している。これらのことは、ARR1 がサイトカイニンシグナル伝達において初発応答遺伝子発現を直接制御していることを示している(Sakai et al., 2001)。

シロイヌナズナにおける ARR1 や ARR2 の過剰発現体は野生型植物体に比べて、根の伸長阻害やカルスの緑化や芽の誘導などのサイトカイニン感受性が上昇していた(Hwang and Sheen, 2001; Sakai et al., 2001)。これとは反対に *arr1-1* 変異体では、サイトカイニンへの感受性が高くなっていた(Sakai et al., 2001)。このことは、タイプ B ARR が植物体におけるサイトカイニンシグナルを正に制御していることを示している。

4. His-Asp リン酸リレー系によるサイトカイニン応答と様々なシグナルとのクロストーク

このように、アラビドプシスのサイトカイニン受容から初発応答遺伝子の発現にいたる経路はサイトカイニン受容体からタイプ B ARR への His-Asp リン酸リレーで行われている(序論・図 4)。サイトカイニン応答を理解するために押さえておく必要があるものとして、初発応答遺伝子としてタイプ B ARR によって直接転写活性化を受けるタイプ A ARR 遺伝子が注目される。タイプ A ARR 遺伝子の変異体解析によりタイプ A ARR が負の制御因子であること(To et al., 2004)と、AHP からのリン酸受容能があること(Imamura et al., 1999)が示されている。これらのことから、サイトカイニンシグナルによりタイプ A ARR が蓄積することによって AHP からタイプ B ARR へのリン酸転移を競合阻害し、結果として負のフィードバックループを形成していることが示唆されている。また、タイプ A である ARR4 は、赤色光シグナル受容体である *PHYB* 遺伝子 (*phytochrome B*) と結合し、赤色光による PHYB の活性化状態を安定化させる(Sweere et al., 2001)。このため、ARR4 過剰発現体では赤色光に過敏になり、このことはサイトカイニンシグナルと赤色光シグナルのクロストークを示唆している。

5. サイトカイニン応答と遺伝子発現

植物体は、サイトカイニンに応答するため、様々な遺伝子の発現パターンを変化させていることはサイトカイニン受容体の発見よりも前から認知されていた(Crowell and Amashino, 1994; Schmulling et al., 1997)。近年、サイトカイニンに応答した遺伝子発現パターンの変化を厳密に調べるため、ゲノムワイドな発現解析が盛んに行われている。シロイヌナズナの根の外殖片をカルス誘導培地から芽誘導培地に移植した場合や(Che et al., 2002)、シロイヌナズナの野生型や形質転換体にサイトカイニンを付加した場合の遺伝子発現パターンの変化を調べた研究が報告されている(Rashotte et al., 2003; Kiba et al., 2004; Brenner et al., 2005; Kiba et al., 2005; Rashotte et al., 2006)。これらにはサイトカイニン合成遺伝子である *ipt* 遺伝子 (*isopentenyl transferase*) の発現を人為的に誘導して植物体内のサイトカイニン量を増加させたときの遺伝子発現パターン変化を調べた研究(Hoth et al., 2003)、サイトカイニン分解酵素 (cytokinin oxidase) 遺伝子である *CKX* の恒常発現により内在のサイトカイニン量を減少させた形質転換体を用いてサイトカイニン付加時の遺伝子発現パターンを調べた研究(Brenner et al., 2005)、His-Asp リン酸リレーの因子である *ARR21* 遺伝子や *ARR22* 遺伝子の過剰発現体を用いてサイトカイニン付加による遺伝子発現パターンの変化を調べた研究(Kiba et al., 2004; Kiba et al., 2005)などが含まれる。

サイトカイニン応答時のゲノムワイドな遺伝子発現解析によって、様々な方法によるサイトカイニンシグナルの活性化に伴い、多くの遺伝子の転写発現量が増加および減少することが明らかとなっている。中でもサイトカイニン付加による遺伝子の転写産物量の増減は非常に迅速である。例えば、シロイヌナズナの約 24,000 遺伝子の発現解析が可能であるマイクロアレイを用いた研究において、WT 植物体へのサイトカイニン負荷後 15 分間の処理によって転写産物量が 71 遺伝子で上昇し、11 遺伝子で減少することが報告されている(Brenner et al., 2005)。サイトカイニン付加に伴う遺伝子の転写産物量の上昇は一貫してタイプ A *ARR* 遺伝子およびいくつかの AP2-like protein 遺伝子で見られる(Rashotte et al., 2003; Kiba et al., 2004; Brenner et al., 2005; Kiba et al., 2005; Rashotte et al., 2006)。AP-2 domain protein 遺伝子は転写因子をコードしており、最近の研究によってサイトカイニン応答シグナル経路においてタイプ B *ARR* と並列な関係でサイトカイニン初発応答に関わっていることが示されている(Rashotte et al., 2006)。これら以外に Cytokinin oxidase 遺伝子、Cytokinin hydroxylase 遺伝子など、サイトカイニン代謝系遺伝子も複数の実験系でサイトカイニン処理後 1 時間以内に転写産物量の増加が確認されており、初発応答遺伝子である可能性が高い(Rashotte et al., 2003; Kiba et al., 2005)。

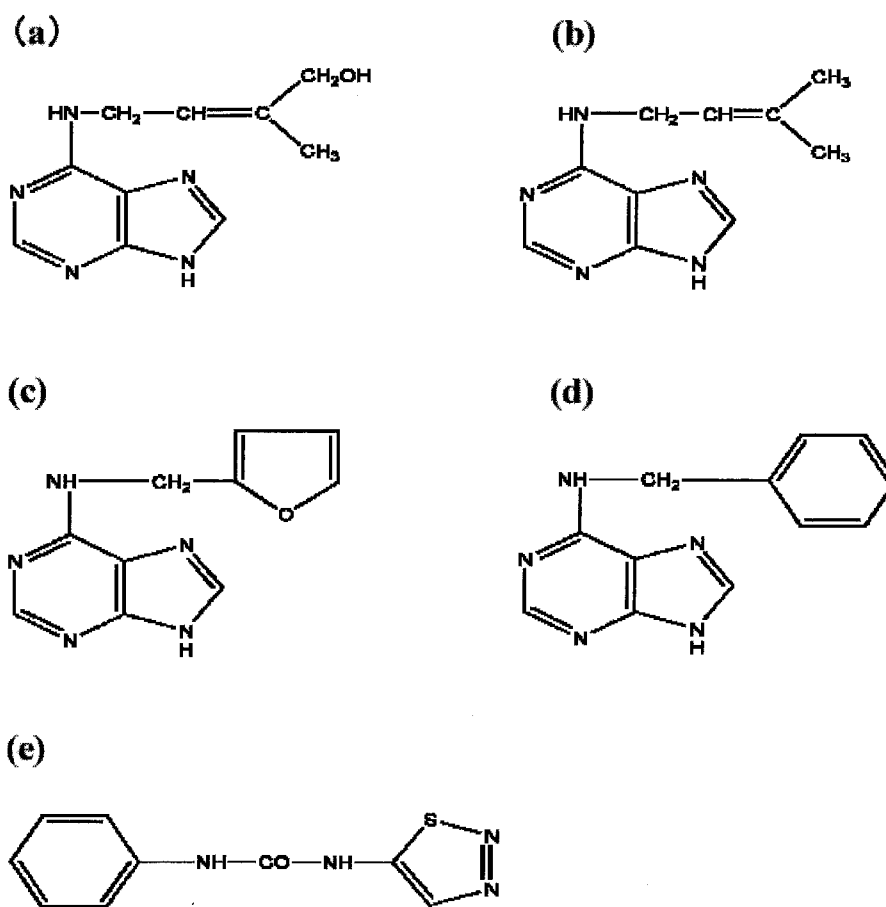
一方、植物個体は様々なサイトカイニン応答現象を制御しているが、そのような現象

の制御に密接に関係している遺伝子の転写産物量の増減に関しても多数の報告がある。例えば、細胞周期の制御に関わる *CycD3;1* 遺伝子の転写産物量の増加は WT 植物体へのサイトカイニン付加後 24 時間で観察される(Riou-Khamlichi et al., 1999)。また、別の細胞周期の制御因子である *CDKA;1* について、*CDKA;1* 遺伝子のプロモーターGUS 融合遺伝子を導入した形質転換体へのサイトカイニン付加後 72 時間処理によって、その根に強い GUS 活性がみられる(Hemerly et al., 1993)。このことから、*CDKA;1* 遺伝子の転写産物量がサイトカイニン付加に依存して増加することが示唆される。サイトカイニン合成に関わる *ipt* 遺伝子の過剰発現によって、シュート形成に関わるホメオボックス遺伝子である *KNAT1* 遺伝子や *STM* 遺伝子の転写産物量の増加がみられる(Rupp et al., 1999)。しかし、このようなサイトカイニン応答現象の制御に関連した遺伝子の転写産物量の増減は、サイトカイニン付加後の早期のゲノムワイドな遺伝子発現解析においては確認されていない(Rashotte et al., 2003; Kiba et al., 2004; Brenner et al., 2005; Kiba et al., 2005; Rashotte et al., 2006)。このことは、サイトカイニン初発応答遺伝子の発現後、様々な遺伝子の発現等の多くの経路を経て植物個体レベルでの応答現象の制御が行われていることを示唆している。

以上に述べたように、サイトカイニンの受容から初発応答遺伝子の転写活性化に至る分子機構として His-Asp リン酸リレー系が存在すること、および ARR1 を含むタイプ B ARR がその転写活性化因子として働くことが現在明らかになっている。一方、サイトカイニン応答遺伝子として、サイトカイニン応答現象への直接の関わりがあるものも含めて、膨大な数の遺伝子が同定されており、これらの発現パターンの変化がサイトカイニン応答現象を引き起こすと考えられている。しかし、これら応答遺伝子のうちどれが初発応答遺伝子であり、どれが多段階の遺伝子発現を介して制御されているものか、さらに、初発応答遺伝子のうちどれがタイプ B ARR によって直接制御されているものかについてはほとんど明らかにされていない。このため、His-Asp リン酸リレーからサイトカイニン応答現象へとつながるシグナル伝達経路については現在のところ全く理解されていないと言ってよい。

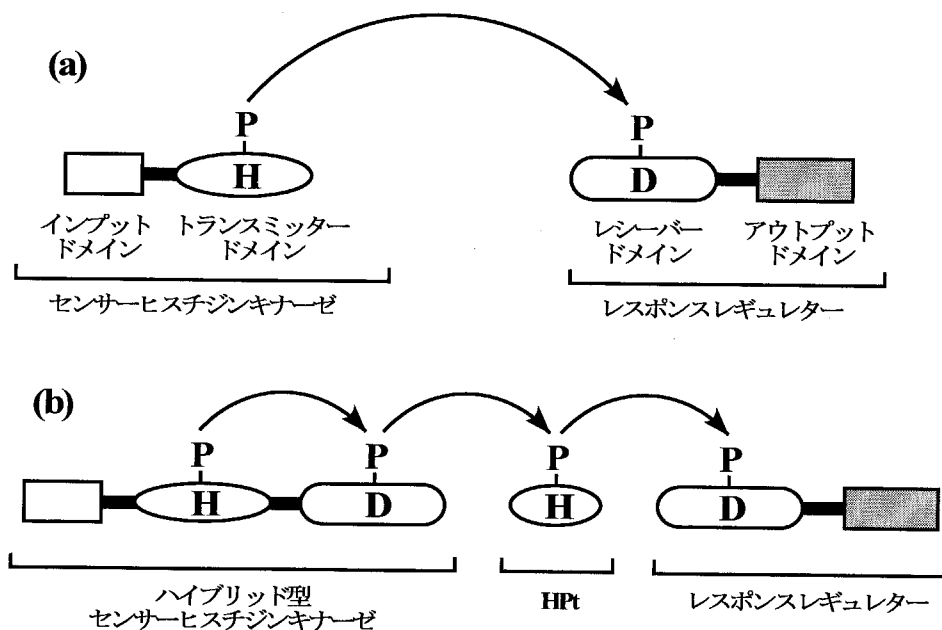
本研究の目的は、サイトカイニンシグナル伝達の初期過程である His-Asp リン酸リレーを出発点として、その下流に展開するシグナル伝達経路を分子レベルで一段ずつ辿ることである。そこで、これまでに開発された、*35S::ARR1::DDK-GR* シロイヌナズナを用いた転写活性化能誘導系を利用して、ARR1 のダイレクトターゲット遺伝子の同定を行った。また、野生型株と *arr1-1* 変異体株におけるダイレクトターゲット遺伝子のサイトカイニン応答性を比較することにより、実際に ARR1 がそれら遺伝子のサイトカイニン初発応答における転写活性化を行うことを確認した。これらの結果、His-Asp リン酸リレーが多様な機能をもつ ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子群の転写活性化を

通して植物個体レベルにおける様々なサイトカイニン応答現象を制御しているという、
サイトカイニンシグナル伝達経路の全体像が明らかとなった。



序論-図 1 代表的なサイトカイニンの骨格構造

(a) trans-zeatin; (b) N6-(2-isopentenyl) adenine (2iP); (c) kinetin; (d) 6-benzylamino purin (BA); (e) thidiazuron



序論-図 2 His-Asp リン酸リレー系によるシグナル伝達

(a) 一般的なリン酸基一段階転移による His-Asp リン酸リレー系。インプットドメインによりインプット刺激を受け取り、トランスミッタードメインからリン酸シグナルとしてレスポンスレギュレーターへと伝達する。リン酸基を受け取ったレスポンスレギュレーターは、アウトプットドメインにより下流へのシグナルの伝達を行っている。

(b) 多段階のリン酸転移による His-Asp リン酸リレー系。(a)のリン酸リレー系のセンサーヒスチジンキナーゼと異なり、トランスミッタードメインとレシーバードメインをともに含むハイブリッド型センサーヒスチジンキナーゼをもつ。また、ハイブリッド型センサーヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーターのためのリン酸基の中継に HPt を伴う。このため、His 残基から Asp 残基へのリン酸転移が多段階によって構成されている。

(a) サイトカイニン受容体 (AHKs)



(b) AHPs



(c) タイプA レスポンスレギュレーター

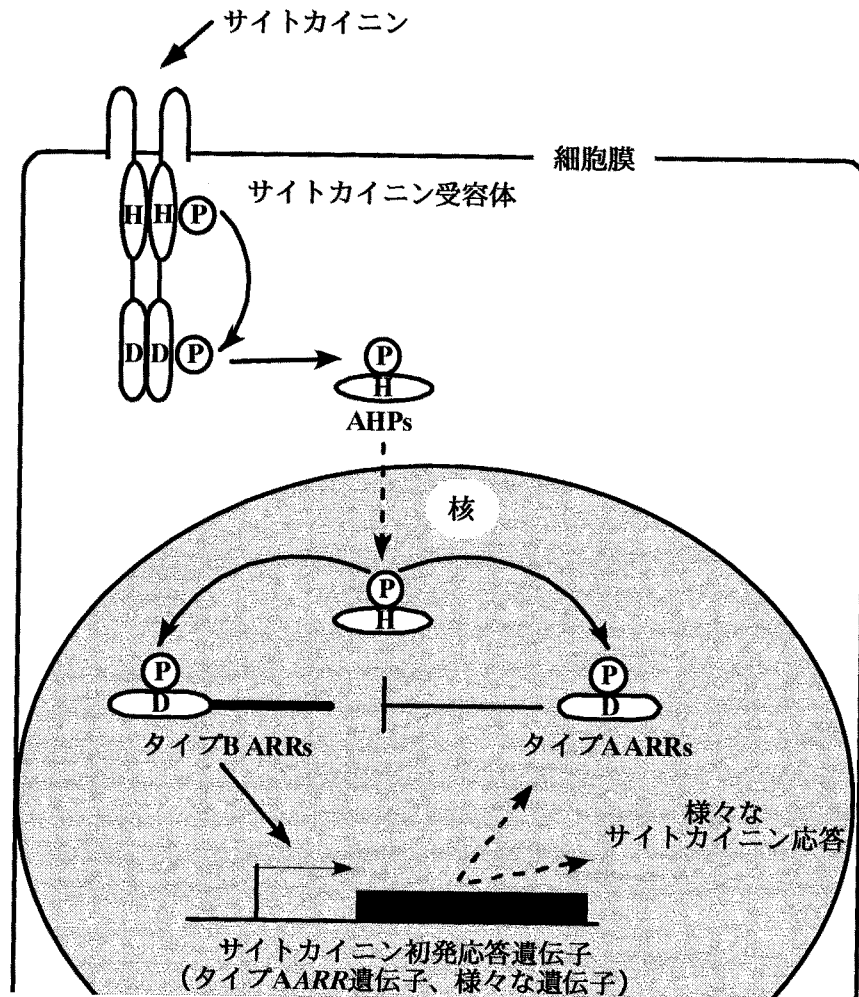


(d) タイプB レスポンスレギュレーター



序論-図 3 アラビドプシスシロイヌナズナにおけるサイトカイニンシグナル構成因子の概略図

TM, 膜貫通ドメイン; CHASE, CASEドメイン; TD, トランスミッタードメイン; RD, レシーバードメイン; GARP, GARPドメイン



序論-図4 シロイヌナズナにおけるサイトカイニンシグナル伝達のモデル図

細胞膜に存在するサイトカイニン受容体によりサイトカイニンが認識され、His-Asp リン酸リレー系で核内のタイプB ARRs へとリン酸シグナルが伝達される。活性化されたタイプB ARRs は初発応答遺伝子の発現を活性化し、様々なサイトカイニン応答を引き起こす。また、初発応答遺伝子であるタイプA ARR 遺伝子のタンパク質産物は、サイトカイニンシグナルを阻害する負のフィードバックループを形成している。

第二章 材料および方法

1. 植物の生育条件

Arabidopsis thaliana (Ecotype Columbia)を野生型植物体 (WT)、および本研究で使用する変異植物体および形質転換植物体の親株として用いた。T-DNA 挿入変異体 (*arr1-1*) および *35S::ARR1ΔDDK::GR* 形質転換体の詳細については、すでに報告されている(Sakai et al., 2001)。種子の発芽および生育は、Murashige-Skoog (MS) 培地 (1% Sucrose, 0.8% Agar) を用いて 22°C、全日条件で行なった。

2. 植物体の薬剤付加処理

22°C、全日条件下でプレート内で生育させた幼苗を MS 培地 (2% Agar) にのせた滅菌水を適度にしみ込ませたる紙上に並べ、適当な覆いを施した。この状態から 2 日間、22°C、全日条件下で徐々に覆いを取り除くことにより、閉鎖的条件から開放条件に順応させて根からの液体の吸収を促進させた。その後、WT 植物体び *arr1-1* 植物体に対しては終濃度 5μM で 6-benzyladenine (BA、DMSO 溶液) を、*35S::ARR1ΔDDK::GR* 植物体に対しては終濃度 30μM で Dexamethasone (DEX、エタノール溶液) を根から吸収させた。また、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX、水溶液) 付加時の条件は終濃度 30μM で、他の薬剤付加と同時に行った。尚、植物体に CHX を付加することにより完全にタンパク質合成が阻害されることは、GVG 誘導型形ルシフェラーゼ遺伝子を導入した質転換植物体を用いて確認している(Ohgishi et al., 2001、材料および方法-表 1)。所定時間処理 (1 時間および 3 時間) を行った植物体は、水分を十分に取り除き液体窒素を用いて凍結し、-80°Cで凍結保存した。

3. 植物体からのノザンプロット用 total RNA の抽出

以下の作業手順により行った。

- ①1~2g の植物体を液体窒素で凍結状態を保ちつつ乳鉢を用いて粉状になるまで破碎する
- ②破碎物を、手早く 55°C の 15ml の抽出バッファーに懸濁する
〔抽出バッファー〕: 50mM Tris-HCl (pH8.0)、300mM NaCl、5mM EDTA、2% SDS、
1mM Aurin Tricarboxylic Acid、10mM 2-メルカプトエタノール
- ③2.1ml の 3M KCl を混合し、氷上に 30 分間放置する
- ④12000 x g、15 分間、4°C で遠心を行う
- ⑤上清を回収し 6ml の 8M LiCl に混合する
- ⑥4°C で一晩静置する
- ⑦12000 x g、15 分間、4°C で遠心を行う

- ⑧上清を捨て、沈殿物を回収する
- ⑨2ml の滅菌水で沈殿を溶解する
- ⑩溶解液についてフェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行う

ここまでの手順により回収された沈殿を滅菌水に懸濁し、Ultrospec 3300 pro (GE Healthcare) で濃度定量を行った。1 μ g/ μ l に調整したもの total RNA ストック溶液として用い、-80°Cで保存した。

4. ノザンブロッティング解析

4-1. total RNA の電気泳動およびメンブレンへの転写

以下の作業手順で行った。

- ①RNA 泳動混合液 (6 μ l total RNA(1 μ g/ μ l)、12.5 μ l ホルムアミド、2.5 μ l 10 x MOPS バッファー、4 μ l ホルムアルデヒド(37% v/v)) を作製する
- ②65°C、5 分間恒温し、水中で急冷する
- ③2.5 μ l の泳動バッファー (0.1mg/ml ブロモフェノールブルー、50%(v/v)グリセロール) と混合する
- ④1.2%ホルムアルデヒド含有アガロースゲル (1.2%アガロース、終濃度 6%ホルムアルデヒド、1 x MOPS) を用いて、定電圧 100V、4°Cで電気泳動を行う
〔10 x MOPS〕: 0.2M 3-Morpholinopropanesulfonic acid (pH7.0)、0.05M 酢酸ナトリウム、0.01M EDTA
- ⑤電気泳動後、20 x SSPE (3.6M NaCl、0.2M リン酸ナトリウム (pH7.7)、0.02M EDTA) を用いて、Hybond-N メンブレン (GE Helthcare) へ泳動産物を 12 時間以上キャピラリーブロットにて転写を行う
- ⑥転写の終了したメンブレンを 30 分間室温で適度に乾燥させ、CI-1000 ULTRAVIOLET CROSSLINKER (UVP) を用いて 120mJ/cm²条件で UV クロスリンクを行う

上記方法により作出した total RNA 転写メンブレンは、使用まで極度な乾燥を避けて保存した。また、使用した 10 x MOPS の作製法については以下に記した。

4-2. ハイブリダイゼーション用プローブのクローニングおよびプローブの放射能ラベル

以下の作業手順で行った。

- ①シロイヌナズナの cDNA を鋳型に特異プライマー (材料および方法-表 2) を用いて PCR により目的断片を増幅する
- ②PCR 産物を pUC19 もしくは pBluescript へのクローニングを行う

- ③クローニング産物について ABI PRISM 310 DNA Sequencer (Applied Biosystems) で配列を確認する
- ④クローニング産物からクローニング時と同様のプライマー*を用いて PCR を行う
- ⑤PCR 産物の増幅をアガロースゲル電気泳動により確認する
- ⑥増幅産物を Micro Spin S-400 Column (GE Healthcare) を用いてプライマー除去し、これを放射能ラベル用時の鋳型とする
- ⑦[α -³²P]dCTP (3000Ci/mmol, PerkinElmer Life Science) および Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2 (TAKARA) を用いてプローブのラベリング反応を行う
- ⑧未反応の[α -³²P]dCTP を ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare) を用いて除去する
- ⑨95 度、5 分間、恒温する
- ⑩氷上にて急冷する

以上の過程にて作出した産物を、ハイブリダイゼーションに用いた。

4-3. RNA プロットハイブリダイゼーション

以下の作業手順で行った。

- ①ハイブリダイゼーション溶液 (5 x SSPE、50%(v/v) ホルムアミド、5 x デンハルト溶液、0.5%(w/v) SDS) に熱変性させた 0.5ml の 1mg/ml 仔ウシ胸腺 DNA を混合する
- ②total RNA を転写したメンブレンを浸し 50°C、1 時間振盪 (プレハイブリダイゼーション) する
- ③熱変性させたプローブを添加する
- ④50°C、12 時間以上振盪する
- ⑤2 x SSPE を用いて 65°C、15 分間の洗浄を 2 回行う
- ⑥1 x SSPE を用いて 65°C、15 分間の洗浄を 2 回行う

以上の方法にプロットINGの終了したメンブレンは、BAS2000 (Fuji Photo Film Co.,Ltd.) を用いてオートラジオグラフィーを行い、放射活性の定量は Image Gauge V4.0 (Fuji Photo Film Co.,Ltd.) で行った。

5. HiCEP 解析

35S-ARR1ADDK-GR 形質転換体への DEX 付加の有無によって 3 時間処理を行い、HiCEP 解析に用いる為の total RNA を ISOGEN (株式会社ニッポンジーン) を用いて抽出した。ISOGEN による total RNA の抽出方法は、付属のマニュアルに従った。HiCEP 解析はメッセンジャー・スケープ株式会社に委託し、すでに報告のある方法に従って行

った(Fukumura et al., 2003)。以下に、作業手順を記載した。

- ①10 μ g の total RNA から 5'末端をビオチン化した oligo(dT)プライマーを用いて一本鎖 cDNA を合成する
- ②作製した一本鎖 cDNA を鋳型に二本鎖 cDNA を合成する
- ③制限酵素 *MspI* で二本鎖 cDNA を切断する
- ④切断された *MspI* サイトにアダプター*をライゲーションする

*5'-AATGGCTACACGAACTCGGTTTCATGACA-3'

5'-CGTGTTCATGAACCGAGTTCGTGTAGCCATT-3'

- ⑤ビオチンを標的にして、Dynabeads M280 Streptavidin (Dynal Biotech) でトラップし、精製を行う
- ⑥Dynabeads M280 Streptavidin に結合させたままで、二本鎖 cDNA を制限酵素 *MspI* で切断する
- ⑦切断された DNA 断片を回収して、*MseI* アダプターとライゲーションする

*5'-AAGTATCGTCACGAGGCGTCCTACTGCG-3'

5'-TACGCAGTAGGACGCCTCGTGACGATACTT-3'

- ⑧16種類の3'末端のバリエーションをもった *MspI* アダプターの配列に依存した蛍光ラベル (6-carboxyfluorescein (FAM) ラベル) プライマー (5'-label-ACTCGGTTTCATGACACGGNN-3') と 16種類の3'末端のバリエーションをもった *MseI* アダプターの配列に依存した蛍光ラベルしたプライマー (5'-AGGCGTCCTACTGCGTAANN-3') を用いて 256 通りの組合わせで PCR を行う
- ⑨PCR 産物を ABI PRISM 310 DNA Sequencer (Applied Biosystems) にて変性ゲル電気泳動し、DNA 断片の長さに応じた泳動距離と PCR による増幅量を蛍光強度 (ピーク) で測定する

以上の作業を、各 total RNA に対して 2 回ずつ行い、同じ PCR プライマーから派生した同じ泳動度の DNA 断片のピークを比較して、候補 DNA 断片の選出を行った。候補 DNA 断片の選出の後、その DNA 断片がどのような遺伝子であるかを同定するために以下の操作を行った。

- ⑩目的の DNA 断片を含む PCR 産物を電気泳動し、ゲルから切り出す
- ⑪切り出したゲルから DNA 断片を抽出する
- ⑫抽出した DNA 断片を鋳型にして、再度同様のプライマーを用いて PCR を行う
- ⑬typhoon9210 (GE Healthcare) を用いて、増幅した DNA 断片の配列を決定する

HiCEP 解析で行った操作のフローチャートを、材料および方法-図 1 に示した。

6. プロモーター配列の抽出

本研究で同定した ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーター領域として各遺伝子の転写開始点 (+1) の上流配列を抽出した。転写開始点の情報は RIKEN のシロイヌナズナデータベースの完全長 cDNA (<http://rarge.gsc.riken.go.jp/cdna/>) を利用した。データベースに存在しなかった遺伝子については、GeneRacer Kit (Invitrogen) を用いて、転写開始点を決定した。また、無作為な 500 遺伝子のプロモーターの抽出は RIKEN データベースを利用して行い、転写開始点上流配列を使用した。

7. ゲルシフトアッセイ

7-1. 大腸菌による組換えタンパク質の発現およびストックタンパク質溶液の作製

GST と ARR1 の GARP ドメイン融合タンパク質の発現には、GARP ドメイン (236 から 299 アミノ酸) をコードする領域を pGEX-2T (GE Healthcare) にクローニングしたコンストラクトを用いた(Sakai et al., 2000)。尚、本研究ではそのコンストラクトから発現するタンパク質を GST-ARR1DBD と記載する。また、GST のみの発現には pGEX-6P-1 を用いた。タンパク質発現およびストックタンパク質の作製は以下の作業手順で行った。

- ①任意のコンストラクトを形質転換した BL21(DE3) Codon plus (Stratagene) の前培養液 2ml を 100ml LB 培地 (0.5% グルコース) に加え、37°C で OD₆₀₀=0.6 になるまで振盪培養する
- ② 終濃度 1mM になるように 1ml の 100mMIPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) を添加する
- ③37°C、3 時間振盪する
- ④3000 x g、5 分間、4°C で遠心して集菌する
- ⑤10ml の結合バッファー*に懸濁する
[結合バッファー]: 20mM HEPES (pH7.4)、100mM KCl、2mM MgCl₂、0.5mM EDTA、1mM DTT、0.2% NP-40、10% glycerol
- ⑥超音波破碎を行う
- ⑦12000 x g、30 分間、4°C で遠心を行う
- ⑧上清を回収する

上記の方法にて回収した溶液を、ブラッドフォード法によるタンパク質定量と SDS-PAGE を行った後、分注して-80°C 保存しストック溶液とした。

* 結合バッファーはタンパク質抽出時にのみ Protease Inhibitor Cocktail

(EDTAfree) (nakalai tesque) をもちいた。

7-2. ゲルシフト用プローブの作製と放射ラベル

以下の作業手順で行った。

- ①任意のプライマーセット*を用いて PCR を行い、pUC19 にクローニングする
- ②クローニング産物について ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) で配列を確認する
- ③クローニング産物からクローニング時と同様のプライマー*を用いて PCR を行う
- ④アガロースゲルにて電気泳動を行い、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてアガロースゲルから DNA 断片を抽出する
- ⑤抽出した DNA 断片溶液を Ultrospec 3300 pro (GE Healthcare) で濃度定量
- ⑥5pmol の DNA を T4 Polynucleotide Kinase (TAKARA) を用いて [γ - 32 P]ATP (6000Ci/mmol、PerkinElmer Life Science) で放射能ラベルを行う
- ⑦フリーの ATP を MicroSpin G-25 Columns (GE Healthcare) で除去する
- ⑧フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿を行う
- ⑨0.1pmol/ μ l で 10mM Tris-HCl(pH8.0)に溶解する

*用いた DNA 断片作成時に使用したプライマーを以下に示す。

- | | |
|------|--------------------------------|
| No.1 | 5'-CATCTCGCTGTCTCCCTCCG-3' |
| | 5'-AACCTCTTTAGATTACCACC-3' |
| No.2 | 5'-TTACTAATTGTAGATTAAGG-3' |
| | 5'-TCACGCATTTAAGTTCTACAC-3' |
| No.3 | 5'-ACTTCCACAATTCAACTAC-3' |
| | 5'-CAAACCAGAAAATTTGGAATGG-3' |
| No.4 | 5'-TTCTTCGTTTTGACTAAACTTG-3' |
| | 5'-ATCTTTAAGATTTTGTCAATTTGC-3' |
| No.5 | 5'-ATGCAAAATCTCTCGATTTTC-3' |
| | 5'-ACGAATGTTGGAGGATTTGG-3' |

7-3. タンパク質と DNA の結合、電気泳動および検出

以下の作業手順で行った。

- ①50ng のタンパク質溶液、2 μ g Poly(dI-dC) (GE Healthcare)、0.2pmol の放射能ラベルした DNA 断片を終濃度が結合バッファの組成になるように混合する
- ②20°C、30 分間恒温する
- ③5%未変性 PAGE を行う
- ④ゲルをろ紙と共に乾燥させ、BAS2000 (Fuji Photo Film Co.,Ltd.) を用いてオー

トラジオグラフィーを行う

8. DNaseI フットプリント

8-1. プロローブのクローニングおよびプロローブの放射能ラベル

- ①ARR6 プロモーター断片を以下のプライマーを用いてアラビドプシスシロイヌナズナのゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、pUC19 の *Hin*DIII サイトおよび *Sa*I サイトを利用してクローニングを行った

5'-CCCAAGCTTTTGGTTTGACTTTTATTTTCGG-3'

5'-CCCGTCGACATGGTGGCAGTGGTTGGGCC-3'

- ②クローニング産物について ABI PRISM 310 DNA Sequencer (Applied Biosystems) で配列を確認した

- ③以下に示す pUC19 に含まれる M13 RV 配列および M13 M4 配列に対するとくい特異プライマーを用いて、PCR でクローニング産物と共に PCR で増幅する

5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'

- ④アガロースゲルにて電気泳動を行い、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてアガロースゲルから DNA 断片を抽出する

- ⑤抽出した DNA 断片溶液を Ultrospec 3300 pro (GE Healthcare) で濃度定量する

- ⑥制限酵素を用いて、濃度定量した PCR 産物に存在する *Hin*DIII サイトを切断したときに生じる長い方の DNA 断片と *Sa*I サイトを切断したときに生じる長い方の DNA 断片をそれぞれ精製する

- ⑦精製したそれぞれの断片に T4 Polynucleotide Kinase および [γ -³²P]ATP (6000Ci/mmol, PerkinElmer Life Science) を用いて放射能ラベルを行う

- ⑧*Hin*DIII サイトを切断した断片は制限酵素を用いて *Sa*I サイトを切断して余分な放射能ラベルを除去し、同様に *Sa*I サイトを切断した断片は *Hin*DIII サイトを切断する

- ⑨Micro Spin S-400 Column (GE Healthcare) を用いて余剰な [γ -³²P]ATP を除去し、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈澱、乾燥を行う。

- ⑩TE に溶解し、使用するまで -20°C で保存した。

8-2. DNaseI フットプリントに用いたタンパク質の精製

DNaseI フットプリントに用いた精製タンパク質は、ゲルシフトアッセイで用いた GST-ARR1DBD を発現する大腸菌を用い、タンパク質の発現誘導および集菌に至るまでは同様に行った。精製は以下の手順で行った。

- ①100ml LB 培地培養から集菌したものを、5ml の破碎バッファーに懸濁して超音波破碎を行う

- 〔破碎バッファー〕: 50mM Tris-HCl (pH8.0)、150mM NaCl、1mM EDTA、Protease Inhibitor Cocktail (EDTA free) (nacalai tesque)
- ②500μl の 10%Triton X-100 を混合し、4°Cで 20 分間振盪する
 - ③12000 x g、30 分間、4 °Cで遠心を行う
 - ④上清を回収し、ポアサイズ 0.45μm の MILLEX-HV (MILLIPORE) フィルターでろ過する
 - ⑤1ml サイズの GSTrap FF (GE Healthcare) カラムにフィルターろ過後の大腸菌粗精製液を通す
 - ⑥10ml の洗浄バッファーで GSTrap FF を洗浄する
〔洗浄バッファー〕: PBS
 - ⑦5ml の溶出バッファーを GSTrap FF に通し、500μl ずつフラクションを回収する
〔洗浄バッファー〕: Tris-HCl (pH8.0)、10mM 還元型グルタチオン
 - ⑧回収したフラクションを SDS-PAGE にて確認する
 - ⑨NAP-5 Columns (GE Healthcare) を用いてバッファーを保存バッファーに置換する
〔保存バッファー〕: 20mM HEPES (pH7.4)、100mM KCl、2mM MgCl₂、0.5mM EDTA、1mM DTT、0.2% NP-40、10% glycerol
 - ⑩バッファー交換後、精製タンパク質として使用するまで-80°Cで保存した。

8-3. タンパク質と DNA の結合および DNaseI 処理

- ①0、3.15、6.25、12.5、25、50pmol のタンパク質溶をそれぞれ 0.15pmol の放射能ラベルした DNA 断片を終濃度が DNA 結合バッファーの組成になるように混合して、全量 50μl になるように調製する。
〔DNA 結合バッファー〕: 20mM HEPES (pH7.4)、50mM KCl、2mM MgCl₂、0.5mM EDTA、10% glycerol、1mM DTT、0.2% NP-40
- ②氷上に 10 分間静置する
- ③50ml の Ca²⁺/Mg²⁺溶液を加えて、25°Cで 1 分間恒温する
〔Ca²⁺/Mg²⁺〕: 5mM CaCl₂、10mM MgCl₂
- ④3μl の DNase 溶液を加えて、25°Cで 1 分間恒温する
〔DNase 溶液〕: RNase-Free DNaseI (TAKARA) を 10mM Tris-HCl (pH8.0)で終濃度 1U/μl に希釈したもの
- ⑤90ul の反応停止溶液を加える
〔反応停止溶液〕: 200mM NaCl、30mM EDTA、1% SDS、100mg/ml Calf Thymus DNA
- ⑥フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿、乾燥を行う

8-4. 電気泳動および検出

電気泳動は、8M 尿素含有 8%アクリルアミドゲルにて行った。泳動終了後のアクリルアミドゲルはろ紙に貼り付け乾燥させ、BAS2000 (Fuji Photo Film Co.,Ltd.) を用いてオートラジオグラフィーを行い放射能の検出をおこなった。尚、シーケンスラダーは fmol DNA Cycle Sequencing System (Promega) を用いて作出した。

9. マイクロアレイ解析

35S-ARR1ΔDDK-GR 形質転換体への DEX 付加の有無によって 1 時間処理を行い、マイクロアレイ解析に用いる為の total RNA を RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。RNeasy Plant Mini Kit による total RNA の抽出方法は、付属のマニュアルに従った。また、マイクロアレイ解析は、タカラバイオ株式会社に委託して GeneChip Arabidopsis ATH1 Genime Array (AFFYMETRIX) を用いて行った。尚、作業のすべては、GeneChip Eukaryotic Target Preparation & Hybridization Manual (AFFYMETRIX) に従って行った。以下に方法を示す。

- ①total RNA から 1 本鎖 cDNA を作製し、次いで 2 本鎖 cDNA を合成する
- ②GeneChip Sample Cleanup Module Kit (AFFYMETRIX) を用いて、2 本鎖 cDNA を精製する
- ③ GeneChip Expression 3'-Amplification Regents for IVT Labeling Kit (AFFYMETRIX) を用いて、Biotin-Labeled cRNA を合成する
- ④GeneChip Sample Cleanup Module Kit を用いて、Biotin-Labeled cRNA を精製する
- ⑤精製した Biotin-Labeled cRNA を断片化する
- ⑥GeneChip Hybridization Control Kit を用いて、Hybridization Control を添加する
- ⑦GeneChip Hybridization Oven 640 を用いて、45 度、16 時間、60rpm でハイブリダイゼーションを行う
- ⑧GeneChip Fluidics Station 450 を用いて洗浄を行う
- ⑨streptavidin-phycoerythrin (Molecular Probes) を用いて染色を行う
- ⑩GeneChip Scanner 3000 を用いてシグナルを検出する
- ⑪GeneChip Operating Software ver. 1.4 を用いて解析を行う

GeneChip Operating Software ver. 1.4 にて数値化されたデータを本研究にてもちいた。

材料および方法-表 1 本研究で行った CHX 付加によるタンパク質合成阻害

GVG 誘導型ルシフェラーゼ遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナは、ルシフェラーゼ遺伝子の転写発現を DEX 付加により人為的に上昇させることが出来る。その形質転換体に対して DEX および CHX の付加を本研究と同様にして行ったルシフェラーゼ活性測定の結果については既に Ohgishi らによって報告されている(Ohgishi et al., 2001)。以下の表は、本研究と同一の実験条件における CHX によるタンパク質合成阻害を確認するために行った実験の結果である。尚、表中のルシフェラーゼ活性の値は、DEX 付加のみ 3 時間処理したものの相対値を 1 としている。

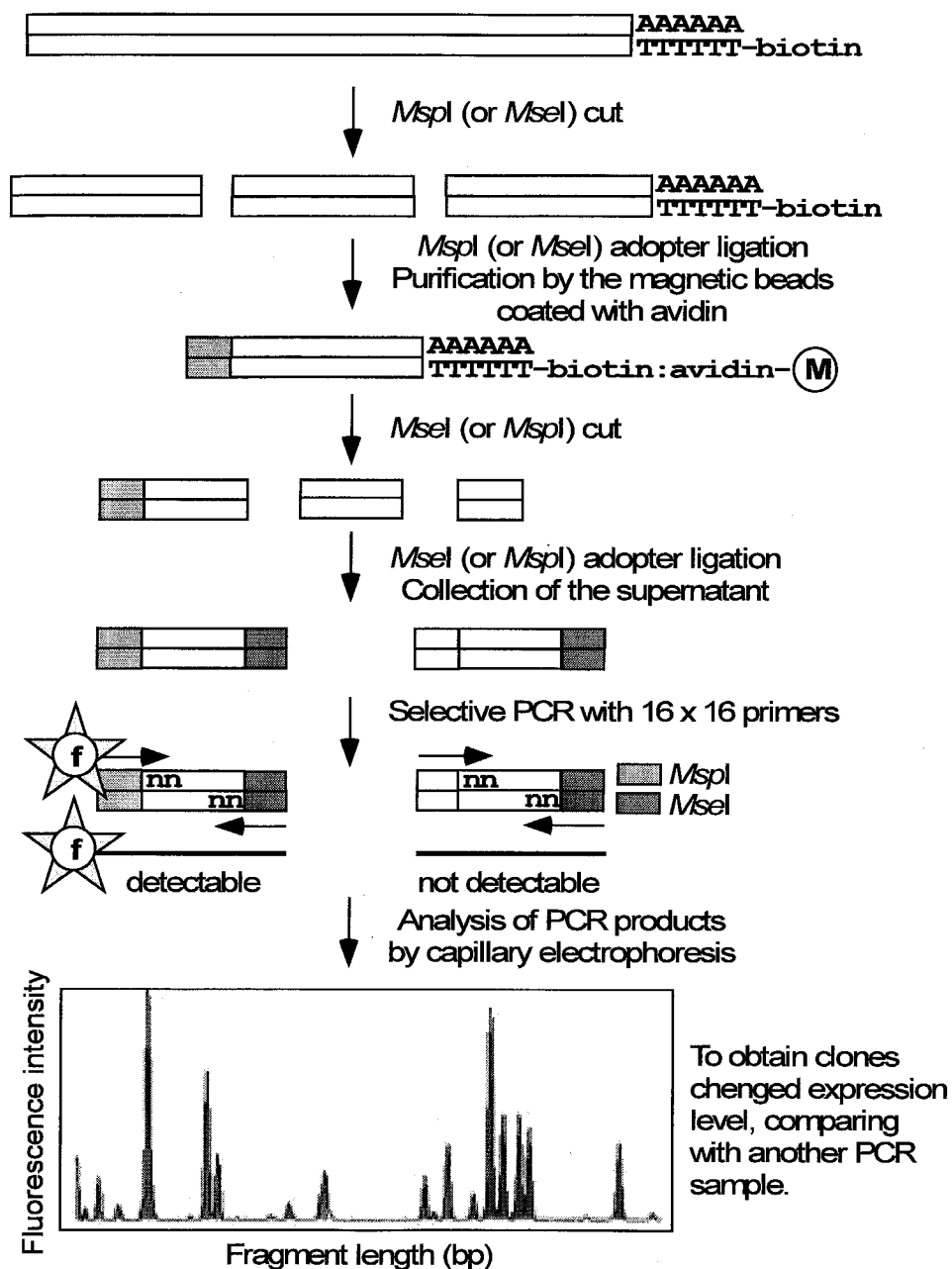
Sample	Period	30mM DEX	30 mM CHX	Relative luciferase Activity
1	0 min	-	-	0.0022
2	30 min	-	-	0.0011
3	1 h	-	-	0.0027
4	3 h	-	-	0.0041
5	30 min	+	-	0.0106
6	1 h	+	-	0.1636
7	3 h	+	-	1.0000
8	30 min	-	+	0.0010
9	1 h	-	+	0.0018
10	3 h	-	+	0.0012
11	30 min	+	+	0.0018
12	1 h	+	+	0.0016
13	3 h	+	+	0.0024

材料および方法-表 2 ノザンプロット解析に用いたプローブ作成時に用いたプライマー

Gene		Primers
Code	Product	
Type-A ARR genes		
At1g59940	ARR3	5'-CCCGTCGACTGAAACCGGTGAAACTCGCC-3' 5'-CCCGGATCCACACAGAGGTAAACTGTCAC-3'
At1g10470	ARR4	5'-CCCGTCGACCGGAAGCTTCCGGAAGATTTC-3' 5'-CCCGGATCCTGGTGAATGTCGAAGGTTTCG-3'
At3g48100	ARR5	5'-CCCGTCGACGTTTCGGTTGGATTGAGGATC-3' 5'-CCCGGATCCGAAAACCCATCTTTGTCACTC-3'
At5g62920	ARR6	5'-CCCGTCGACGCCTCGTATTGATAGATGTC-3' 5'-CCCGGATCCGTGAGGCTTCTTAACAACTTC-3'
At1g19050	ARR7	5'-CCCGTCGACAGATGGAGGCAAAGGGGCTTC-3' 5'-CCCGGATCCGTGTGATGACTCTCTCAAAC-3'
At2g41310	ARR8	5'-CCCGTCGACGAAAAGCAATGGAAGAAGTGG-3' 5'-CCCGGATCCCTCGAAAAGCTTCAATCTTTGTC-3'
At3g57040	ARR9	5'-CCCGTCGACGTCCTCAGAGAACGTTCTCTG-3' 5'-CCCGGATCCTCCCCACATACAACATCATC-3'
At1g74890	ARR15	5'-CCCGTCGACGAGAGATTGCTTAAGATCTC-3' 5'-CCCGGATCCGATCCTCTTGGAAGATGGAG-3'
At2g40670	ARR16	5'-CCCGTCGACATGAACAGTTCAGGAGGTTTC-3' 5'-CCCGGATCCGCTTCTGCAGTTCATGAGATG-3'
At3g56380	ARR17	5'-CCCGTCGACATGAATAAGGGCTGTGGAAG-3' 5'-CCCGGATCCCTTCTGCAATTTAAAAGATGG-3'
Cytokinin-responsive genes		
At4g29740	Cytokinin oxidase CKX4	5'-CCCGTCGACACAAGGGTGAAATGGTCTCGC-3' 5'-CCCGGATCCGGGATAGAAGAGAGTAACACC-3'
At2g46310	AP2-like transcription factor	5'-CCCGTCGACTGCGGCGGAGATTTCGTGATCC-3' 5'-CCCGGATCCCTGAAATCTCCGATCACTCCC-3'
At1g67110	Cytokinin dehydrogenase CYP735A2	5'-CCCGTCGACCTTTGTGCTCAAGCCACTCGC-3' 5'-CCCGGATCCTTTAGGGATGATTAGGTCAAC-3'
At4g11190	Putative disease resistance response protein	5'-CCCGTCGACATAATGGCAAACCAAATCTAC-3' 5'-CCCGGATCCACGGAATACTTACTGCCTTC-3'
At4g23750	AP2-like transcription factor	5'-CCCGTCGACGAGAGAAGAAAATGGTTCTACC-3' 5'-CCCGGATCCTAGTCAGAGCGTCGGGACCAC-3'
At2g30540	Putative glutaredoxin	5'-CCCGTCGACAGCGAGGTTTAATCTCAGGCG-3' 5'-CCCGGATCCCATTAACAAAGGTTGCATAGGC-3'
At1g69530	Expansin EXP1	5'-CCCGTCGACCTCAATTGTCGTCACAGCCAC-3' 5'-CCCGGATCCCTCAATTGAAAGAAAGGACC-3'
At2g29490	Putative glutathione S-transferase	5'-CCCGTCGACCTGGAGCTAAACCCGCTTCAC-3' 5'-CCCGGATCCTGCAATTTTGGTCATGCGCTC-3'
At4g19030	Nodulin-like protein NIP1;1/NLM1	5'-CCCGTCGACTTGCCTTCGCCTCTGTGGCC-3' 5'-CCCGGATCCCGGTCCTTAGAAATGAACCAC-3'
At4g11210	Putative disease resistance response protein	5'-CCCGTCGACTCTCCTTGATCTGCTTGTCTG-3' 5'-CCCGGATCCGACGCGGAAATACTTACTGCC-3'
At2g40230	Putative transferase-family protein	5'-CCCGTCGACTACTCCTTCCGACCAAACACC-3' 5'-CCCGGATCCCGTTTTAACTCGGTTTGACTC-3'
At1g04240	AUX/IAA-family protein IAA3/SHY2	5'-CCCGTCGACAGAGCTGAGGCTGGGATTACC-3' 5'-CCCGGATCCCTTCTGATCCTTTTCATGATCC-3'
At2g20520	Fasciclin-like arabinogalactan protein FLA6	5'-CCCGTCGACAGTCCCATCAATCTCACAGCG-3' 5'-CCCGGATCCCATCAGACGATGAAGTTGAGG-3'

材料および方法・表 2 (続き)

Genes related to cytokinin-responsive phenomena		
At3g48750	Cyclin dependent kinase CDKA;1	5'-CCCGTCGACCGGTGTGGTTTATAAGGCAC-3' 5'-CCCGGATCCGGATACCGAATGCTCTGGCC-3'
At4g34160	D-type cyclin CYCD3;1	5'-CCCGTCGACCCCTTTGACCCTCTTTCATAACC-3' 5'-CCCGGATCCACTCTATCAAGCCATGGCAC-3'
At1g62360	Homeodomain protein STM	5'-CCCGTCGACAGTATGAGCAAGAGCTCTCC-3' 5'-CCCGGATCCGGTGAGGATGTGTTGCGTCC-3'
At1g29930	Chlorophyll A-B binding protein CAB1	5'-GAGTGTGAGAGGAGAAAAGAGAGCTTG-3' 5'-TCAATTGTGGTAATAAACTCTGCAATTGAG-3'
Genes activated ARR1/ADK-GR		
At3g62930	Putative glutaredoxin	5'-AGTTGAAGACAAACCAGTGG-3' 5'-TTACACCCATATGGCTCCGG-3'
At1g76410	RING finger protein	5'-CCCGTCGACCAATGGCGCGCCTTCTCTTCC-3' 5'-CCCGGATCCTCGGGTATCGGGTTCGGGTCC-3'
At3g44610	Putative protein kinase	5'-CCCGTCGACCCGATCTCAGATTCCGTCTCC-3' 5'-CCCGGATCCAAGATTGTTCCGGTTCAGCAC-3'



材料および方法-図 1 HiCEP 解析の方法を示したフローチャート

HiCEP 解析で行う操作をフローチャートにしてまとめた。詳しい内容については材料および方法の HiCEP 解析の解説および Fukumura らの報告(Fukumura et al., 2003)を参照。

第三章 結果

1. ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子同定のための戦略

本研究では、転写因子である ARR1 によって直接転写活性化されるダイレクトターゲット遺伝子を同定するために、ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子の候補に対して個別にノザンプロット解析を行うこととした。ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子の判定には、DDK ドメインを除いた、恒常的な転写活性化能をもつ ARR1 Δ DDK と哺乳類のグルココルチコイドレセプターのホルモン結合ドメイン (GR-HBD) を融合させた ARR1 Δ DDK-GR タンパク質を発現する、*35S-ARR1 Δ DDK-GR* 形質転換体 (Sakai et al., 2001) を用いた。GR-HBD を融合させたタンパク質は、dexamethazone (DEX) を付加することにより人為的に活性化することが出来る (Picard et al., 1988; Picard, 1994、結果-図 1)。このような GR-HBD 融合タンパク質の活性化誘導機構が cycloheximide (CHX) のようなタンパク質合成阻害剤によって阻害されないことを応用して、シロイヌナズナにおいて様々な転写因子のターゲット遺伝子が同定されている。例としては、花成に関わる CONSTANS (CO)、雄蕊や花弁の形成に関わる APETALA3/PISTILLATA、花の形成に関わる APETALA1 等の転写因子と GR-HBD 融合タンパク質を用いたターゲット遺伝子の同定があげられる (Sablowski and Meyerowitz, 1998; Wagner et al., 1999; Samach et al., 2000)。同様に ARR1 に関しても、ARR1 Δ DDK-GR が特異的な遺伝子認識能および転写活性化能を保持しており、DEX による転写活性化能の調節が厳密なものであることが示されている (Sakai et al., 2001、結果-補足図 1)。これらのことから、ARR1 Δ DDK-GR のダイレクトターゲット遺伝子は ARR1 のダイレクトターゲット遺伝子であると考えられる (Sakai et al., 2000; Sakai et al., 2001)。

そこで、*35S-ARR1 Δ DDK-GR* 形質転換体に対して DEX および CHX の付加を組合せて行い、各薬剤付加後所定時間経過した植物体より抽出した total RNA を用いてノザンプロット解析を行うことにした。そして、CHX 付加によって新規のタンパク質合成を必要とする転写活性化を阻害した場合にも DEX 付加によって転写産物量が上昇する遺伝子を ARR1 のダイレクトターゲット遺伝子と判定した (結果-図 2)。同時に、野生型植物体 (WT) と *ARR1* 遺伝子欠損変異体 (*arr1-1*) にサイトカイニンである 6-benzyl aminopurin (BA) および CHX の付加を組み合わせを行い、同様のノザンプロット解析を行った。WT 植物体を用いた結果から、CHX 付加条件下においても BA 付加によって転写産物量が上昇する遺伝子はサイトカイニン初発応答遺伝子と判定することが出来る (結果-図 2)。また、WT と *arr1-1* への BA および CHX の付加による遺伝子発現量の比較によってその遺伝子の転写活性化における ARR1 の寄与を判定することが出

来る（結果-図 2）。各薬剤付加後の処理時間を定めるにあたって、それぞれの遺伝子によって適切な時間が異なることが予想されたので、1 時間および 3 時間の誘導を行った。尚、本研究では CHX 付加によるタンパク合成阻害で、植物体がダメージを受けるのを回避するために 3 時間を越える処理は行わなかった。

2. ARR1 によるタイプ A *ARR* 遺伝子の転写活性化

これまでに *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体を用いた研究において、タイプ A *ARR* 遺伝子のうち *ARR4*, *ARR5*, *ARR6*, *ARR7*, *ARR8*, *ARR9* が ARR1 のダイレクトターゲットであることが示されている (Sakai et al., 2001)。そこでまず初めに、それら以外のタイプ A *ARR* 遺伝子である *ARR3*, *ARR15*, *ARR16*, *ARR17* について、ARR1 のダイレクトターゲットであるかどうかを調べた。その結果、1 時間または 3 時間処理の *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体において、すべてのタイプ A *ARR* 遺伝子が、CHX を付加の有無に関わらず、DEX 付加によって転写産物量が上昇することを確認した（結果-図 3、4、5、6）。このことは、植物体において ARR1ΔDDK がすべてのタイプ A *ARR* 遺伝子の転写を直接活性化できることを示しており、それら遺伝子が ARR1 のダイレクトターゲットであることを示している。また、WT 植物体への BA 付加において、付加後 1 時間または 3 時間の処理で CHX 付加の有無に関係なくすべてのタイプ A *ARR* 遺伝子の転写産物量の上昇がみられた（結果-図 3、4、5、6）。このことは、これまでに調べられたタイプ A *ARR* 遺伝子がすべて初発応答遺伝子であったことと一致する (Brandstatter and Kieber, 1998; D'Agostino et al., 2000)。*arr1-1* 変異体への BA および CHX を共に付加した場合の転写産物量は WT 植物体と比較して付加後 3 時間処理において *ARR4*, *ARR6*, *ARR7*, *ARR15*, *ARR16*, *ARR17* で非常に減少しており、*ARR5* と *ARR8* に関しても若干の減少がみられた。*ARR3* と *ARR9* に関しては、1 時間処理においてその減少が明瞭に観察された（結果-図 3, 4）。このことは、程度の違いはあるものの、すべてのタイプ A *ARR* 遺伝子のサイトカイニン応答に対して、ARR1 の転写活性化機能が寄与していることを示している。ここで行った DEX 付加や BA 付加による遺伝子の転写発現の結果から、すべてのタイプ A *ARR* 遺伝子のサイトカイニン初発応答における転写活性化は ARR1 によって行われていることが明らかとなった。

3. ARR1 によるタイプ A *ARR* 遺伝子以外のサイトカイニン応答遺伝子の転写活性化

次に、タイプ A *ARR* 遺伝子以外のサイトカイニン応答遺伝子についての解析を行った。サイトカイニン応答遺伝子の研究のひとつとして、Rashotte らによってサイトカ

イニンの種類や処理時間を 10 通りに変化させた設定条件でマイクロアレイ解析が行われている(Rashotte et al., 2003)。本研究では、Rashotte らの行ったマイクロアレイにおいてサイトカイニン付加により少なくとも 6 つの設定条件で 2 倍以上の遺伝子発現の上昇が見られた遺伝子を選抜した。それらの遺伝子は、タイプ A *ARR* 遺伝子である *ARR4*, *ARR5*, *ARR7*, *ARR16* とそれ以外の 13 の遺伝子である。ここでは、タイプ A *ARR* 遺伝子以外の 13 遺伝子について、タイプ A *ARR* 遺伝子で行ったノザンプロット解析と同様の解析を行った。尚、13 の遺伝子の名前と予測される機能は結果-表 1 にまとめた。

まず、これらの遺伝子がサイトカイニン初発応答遺伝子であるかどうかを調べた。その結果、13 遺伝子のすべてにおいて CHX 付加を伴わない BA 付加により転写産物量の上昇が見られた(結果-図 7、8、9、10)。また、CHX 付加を伴った場合の BA 付加については、3 時間処理で *FLA6* と 2 つの AP2-like protein 遺伝子以外の遺伝子で転写産物量の上昇が見られ(結果-図 9、10)、1 時間処理において *FLA6* の産物量の上昇が見られた(結果-図 7、8)。このことより、2 つの AP2-like protein 遺伝子以外の 11 遺伝子がサイトカイニンの初発応答遺伝子であることが分かった。また、*35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体に DEX 付加をおこなった結果、CHX 付加の有無に関わらず 11 のサイトカイニン初発応答遺伝子のうち putative glutathione-S-transferase (GST) 遺伝子と *NIP1/NLM1* 遺伝子以外のすべての遺伝子が、*ARR1* のダイレクトターゲット遺伝子であると判明した(結果-図 7、8、9、10)。

13 遺伝子のうち *CKX4*、*CYP735A2*、2 つの putative disease-resistance-response-protein (DDRP) 遺伝子、*EXP1*、*IAA/SHY*、*FLA6* の 9 遺伝子がサイトカイニンの初発応答遺伝子であり、かつ *ARR1* のダイレクトターゲットであることが明らかとなったが、次にこれらの遺伝子がサイトカイニン応答時に *ARR1* によって転写活性化されているかどうかを調べた。WT 植物体と *arr1-1* 変異体に BA および CHX を共に付加したことによる転写産物量の変化を比較した場合、3 時間処理において *CYP735A2*、*IAA3/SHY*、putative transferase-family-protein 遺伝子、2 つの putative DDRP 遺伝子の転写産物量が *arr1-1* 変異体で減少しており、1 時間処理においては *CKX4* の転写産物量の減少がみられた(結果-図 7、8、9、10)。このことから、少なくともこの 6 遺伝子に関しては、サイトカイニン初発応答における転写活性化は *ARR1* によって行われていることが明らかとなった。

さらに、サイトカイニン応答により引き起こされる植物体の諸現象に密接に関与している遺伝子について同様にノザンプロット解析を行った。調べた遺伝子は、細胞増殖に関わる *CDKA;1* (*CDC2a*) と *CYCD3;1*、芽の形成に関わる *STM*、クロロプラストの発達に関わる *CAB1/Lhcb1*3* である。これら遺伝子についてはサイトカイニン応答によってその転写産物量に変化することが既に報告されている(Flores and Tobin, 1986; Hemerly et al., 1993; Soni et al., 1995; Riou-Khamlichi et al., 1999; Rupp et al.,

1999)。解析の結果、*CYCD3;1* についてのみで WT 植物体に対する CHX 付加を伴わない BA 付加による転写産物量の上昇が確認されただけで、それ以外の遺伝子に関して変化はみられなかった（結果・図 11、12）。また、*35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体への DEX 付加によっては、これらのどの遺伝子についても転写産物量の上昇はみられなかった（結果・図 11、12）。

4. HiCEP 解析による新たな ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子の探索

高い分離能で転写産物の比較定量解析が出来る High Coverage Expression Profiling (HiCEP) 解析を行い(Fukumura et al., 2003)、新たな ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子の探索を行った。*35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換植物体に DEX 付加の有無により 3 時間処理を行ったものから total RNA を抽出し、HiCEP 解析による解析に用いた。解析により、約 18000 のピークを同定した。ARR1ΔDDK-GR により転写活性化されたと考えられる候補遺伝子のピークの選抜には DEX 付加によって得られたピークの蛍光強度が 500 以上でかつ、DEX 未付加と付加を比較した場合の蛍光強度が 1.5 倍以上というしきい値を設けた（結果・図 13）。その結果、条件を満たす 18 のピークを分取し、ピークに該当する遺伝子を同定した。これらの遺伝子の中には、既に本研究によって明らかにされた ARR1 のダイレクトターゲット遺伝子である *ARR4* と *CKX4* が含まれており、それ以外に 16 の候補遺伝子が得られた（結果・表 2）。候補遺伝子に関しては、HiCEP 解析の確認の為に、ノザンプロット解析によって DEX 付加後 3 時間処理によって遺伝子の転写産物量が上昇するかどうかを解析し、その後、各薬剤付加後 1 時間および 3 時間処理のノザンプロット解析により ARR1 のダイレクトターゲット遺伝子であるかどうか、およびサイトカイニン応答遺伝子であるかどうかの検定を行った。

ノザンプロット解析により putative glutaredoxin 遺伝子 (At3g62930)、RING-finger protein 遺伝子 (At1g76410)、putative protein kinase 遺伝子 (At3g44610) の 3 つの遺伝子が DEX を付加した *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換植物体で転写活性化されることが明らかとなった（結果・図 14、15）。しかし、ノザンプロット解析によってそれら 3 遺伝子以外の 13 遺伝子に関しては DEX 付加した *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換植物体で転写産物量が上昇するといった結果は得られなかった（結果・図 14、15）。得られた 3 つの遺伝子の転写産物量は、*35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換植物体への CHX 付加を伴った DEX 付加によって、3 時間処理で putative glutaredoxin 遺伝子と putative rotein kinase 遺伝子の転写活性化がみられ、1 時間処理で RING-finger protein 遺伝子の転写発現がみられた（結果・図 14、15）。このことは、3 遺伝子がすべて ARR1 のダイレクトターゲット遺伝子であることを示している。また、WT 植物体への CHX 付加を伴わない BA 付加によって 3 遺伝子共に転写産物量が上昇するが、CHX

付加時には RING-finger protein 遺伝子のみで転写産物量の上昇が見られた（結果-図 14、15）。*arr1-1* 変異体に対する BA の付加による RING-finger protein 遺伝子の転写産物量の上昇は、薬剤付加後 1 時間処理において明らかに WT 植物体と比較して減少している（結果-図 14、15）。これらの結果により、RING-finger protein 遺伝子が、サイトカイニンの初発応答において ARR1 により直接転写活性化されることが明らかとなった。

5. ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーターに含まれる ARR1 の *in vitro* 結合配列の近傍配列の解析

ARR1 は *in vitro* で 5'-GAT(T/C)-3' に結合することが既に示されている (Sakai et al., 2000)。しかし、この結合配列は理論的には 85.3bp に一度の確率で出現することになり、ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子を同定する基準として用いるにはあまりに短すぎる。そこで、植物における ARR1 による直接の転写活性化に必須な配列を予測するために、本研究で得られた 23 の ARR1 のダイレクトターゲット遺伝子のプロモーター配列の解析を行った。その為にまず、各 ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子の転写開始点上流 500bp の DNA 配列を抽出した。また、ARR1 のダイレクトターゲット遺伝子上流配列との比較に用いるために無作為に遺伝子を選抜し、同様に上流 500bp の配列を抽出した。その後、それぞれのプロモーター配列に存在する ARR1 の *in vitro* 結合配列 5'-GAT(T/C)-3' の出現頻度を調べた。その結果、無作為に抽出したプロモーターには ARR1 の *in vitro* 結合配列が 1 つのプロモーターにつき平均 7.54 箇所存在するのに対し、本研究で明らかとなった ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーターには 1 つのプロモーターに対して平均 9.26 箇所存在することが明らかとなった (data not shown)。また、ARR1 結合配列の分布には特徴は見受けられなかった (data not shown)。

次に、ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーターに存在する ARR1 の *in vitro* 結合配列の 5' および 3' に隣接する DNA の配列がどのような傾向があるか調べた。その結果、ARR1 の *in vitro* 結合配列である 5'-GAT(T/C)-3' は、ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーターと無作為に抽出した遺伝子のプロモーター共に、A/T リッチな領域に存在する傾向が強いことが確認された（結果-図 16）。また、特徴的にダイレクトターゲットのプロモーターは、ARR1 の *in vitro* 結合配列の 3' 側の 2 塩基に T の存在する傾向が (52.5% と 50.2%)、無作為に抽出した遺伝子のプロモーターの場合 (37.5% と 31.7%) と比較して強いことが明らかとなった。さらに、5' 側の 2 塩基には A の存在する傾向が (41.6%、43.2%)、無作為に抽出した遺伝子のプロモーターの場合 (30.6% と 29.4%) と比較して高いことが明らかとなった（結果-図 16）。

ここまでの結果を反映した、ARR1 結合配列の 5' 側に AA を付加した

5'-AAGAT(T/C)-3'または3'側にTTを付加した5'-GAT(T/C)TT-3'は無作為に抽出した遺伝子のプロモーターには1つのプロモーターにつき平均1.75箇所存在するのに対して、ARR1のダイレクトターゲット遺伝子のプロモーターには1つのプロモーターにつき平均3.98箇所とより高い出現頻度であった。さらに、5'および3'の付加的配列の特徴を両方採用した5'-AAGAT(T/C)TT-3'の場合には、無作為に抽出した遺伝子のプロモーターには一つのプロモーターに平均0.094箇所存在するのに対し、ARR1のダイレクトターゲット遺伝子のプロモーターには0.826箇所とより高い出現頻度であった。これらの配列の存在箇所を23のARR1のダイレクトターゲット遺伝子の転写開始点上流1,000bpについて図に示した。(結果-図17)

6. *ARR6* 遺伝子のプロモーターに対する ARR1 の DNA 結合ドメインの結合様式の解析

ダイレクトターゲットである *ARR6* 遺伝子のプロモーターに ARR1 が結合しているかどうかを調べるために、ARR1 の DNA 結合ドメインである GARP ドメインと GST を融合したタンパク質 (GST-ARR1DBD) を用いてゲルシフトアッセイを行った。作製した *ARR6* 遺伝子のプロモーター断片に対して GST-ARR1DBD タンパク質は様々な強度で結合を示したが、GST のみではそのような結合は確認できなかった(結果-図18)。結果-図18に示したように、ARR1 の *in vitro* 結合配列である 5'-GAT(T/C)-3'の近傍に付加的な配列が含まれた 5'-AAGATT-3'、5'-GATTTT-3'、5'-AAGATTTT-3' のいずれかが3ヶ所存在する No.4 の DNA 断片への結合が極めて強く、1ヶ所のみ存在する No.3 と No.5 の DNA 断片には No.4 より弱い結合がみられた。これとは異なり、ARR1 結合配列の存在しない No.1 や No.2 の DNA 断片では、5'-GAT(T/C)-3'配列がそれぞれ複数存在するにも拘らず、そのような顕著な結合はみられなかった(結果-図18)。さらに *ARR6* 遺伝子のプロモーターのどの配列に結合しているのかを調べるために、転写開始点上流の *ARR6* プロモーター約 220bp に対して GST-ARR1DBD を用いた DNaseI フットプリント解析を行った。その結果、結果-図で示したようにゲルシフトアッセイで用いた No.3DNA 断片に存在する②や③の 5'-AAGATTTT-3 配列や No.4DNA 断片に存在する④の 5'-GATTTT-3'配列を含む領域を GST-ARR1DBD タンパク質が DNaseI から保護していることが示された(結果-図19)。特に③や④への保護の程度は、プラス鎖およびマイナス鎖で共に強かった(結果-図19)。それとは異なり、ゲルシフトで用いた No.3DNA 断片に存在する①の 5'-GATTTT-3'配列の GST-ARR1DBD タンパク質による DNaseI からの保護は確認できなかった(結果-図19)。これらの結果から、ARR1 のダイレクトターゲット遺伝子プロモーター中の DNA 結合配列に対する結合には何らかの指向性があることが示唆された。

結果-表 1 ノザンプロット解析結果のまとめ

Gene		Result of the Northern blot analysis ^a				
Code	Product	Induction by BA in the wild type ^b		Effect of <i>arr1-1</i> in the presence of CHX ^c	Induction by DEX in 35S-ARR1ΔDDK-GR ^b	
		In the absence of CHX	In the presence of CHX		In the absence of CHX	In the presence of CHX
Type-A ARR genes						
At1g59940	ARR3	+	+	+	+	+
At1g10470	ARR4	+	+	+	+	+
At3g48100	ARR5	+	+	+	+	+
At5g62920	ARR6	+	+	+	+	+
At1g19050	ARR7	+	+	+	+	+
At2g41310	ARR8	+	+	+	+	+
At3g57040	ARR9	+	+	+	+	+
At1g74890	ARR15	+	+	+	+	+
At2g40670	ARR16	+	+	+	+	+
At3g56380	ARR17	+	+	+	+	+
Cytokinin-responsive genes						
At4g29740	Cytokinin oxidase CKX4	+	+	+	+	+
At2g46310	AP2-like transcription factor	+	-	n.d.	+	-
At1g67110	Cytokinin dehydrogenase CYP735A2	+	+	+	+	+
At4g11190	Putative disease resistance response	+	+	+	+	+
At4g23750	AP2-like transcription factor	+/-	-	n.d.	+	+
At2g30540	Putative glutaredoxin	+/-	+	-	+	+
At1g69530	Expansin EXP1	+	+	-	+	+
At2g29490	Putative glutathione S-transferase	+	+	-	-	-
At4g19030	Nodulin-like protein NIP1;1/NLM1	+	+	-	-	-
At4g11210	Putative disease resistance response	+	+	+	+	+
At2g40230	Putative transferase-family protein	+	+	+	+	+
At1g04240	AUX/IAA-family protein IAA3/SHY2	+/-	+	+	+/-	+
At2g20520	Fasciclin-like arabinogalactan protein	+	+	-	+	+
Genes related to cytokinin-responsive phenomena						
At3g48750	Cyclin dependent kinase CDKA;1	-	-	n.d.	-	-
At4g34160	D-type cyclin CYCD3;1	+	-	n.d.	-	-
At1g62360	Homeodomain protein STM	-	-	n.d.	-	-
At1g29930	Chlorophyll A-B binding protein CAB1	-	-	n.d.	-	-
Genes activated ARR1ΔDDK-GR						
At3g62930	Putative glutaredoxin	+	+	-	+	+
At1g76410	RING finger protein	+	+	+	+	+
At3g44610	Putative protein kinase	+	-	n.d.	+	+

^a 転写産物量変化からの判定は、独立した 2 回以上のノザンプロット解析により行った。

^b 「+」、「-」、「+/-」は、それぞれ WT 植物体に BA 付加後 1 時間および 3 時間処理することによって転写産物量が「顕著に増加した」、「微妙な増加であった」、「検出できなかった」を示している。

^c 「+」と「-」は、それぞれ WT 植物体と *arr1-1* 変異体に CHX 付加を伴った状態で BA 付加後 1 時間および 3 時間処理することによる転写産物量変化を比較して、変化の差異が顕著であったか、微妙であったかを示している。また、「n.d.」は、WT 植物体に CHX を加えない状態で BA を付加したときに転写産物量の上昇が見られなかったので判定できなかったことを示している。

^d 「+」、「-」、「+/-」は、それぞれ 35S-ARR1ΔDDK-GR 形質転換体に DEX 付加後 1 時間および 3 時間処理することによって転写産物量が「顕著に増加した」、「微妙な増加であった」、「検出できなかった」を示している。

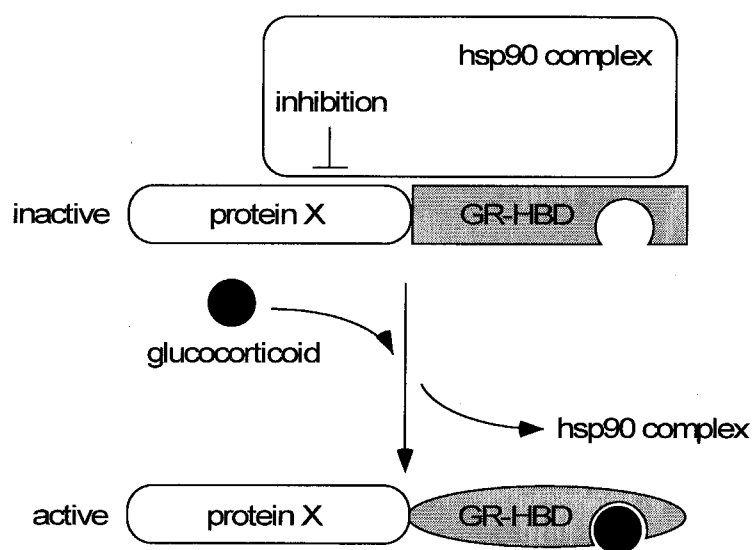
結果-表 2 HiCEP 解析によって選出した ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子候補

Gene ^a		cDNA fragment detected by HiCEP			DEX-treated level of fluorescence ^b	Magnitude of induction ^c
Code	Product	Length of cDNA (bp)	MspI-end sequence	MseI-end sequence		
At3g62950	Putative glutaredoxin	98	CCGGCG	GCTTAA	1272	3.16
At4g29740	Cytokinin oxidase CKX4	122	CCGGAC	AATTAA	1382	2.52
At3g18780	Actin ACT2	70	CCGGTT	AGTTAA	533	2.42
At5g53490	Thylakoid lumenal protein	116	CCGGTC	CCTTAA	628	1.96
At3g44610	Putative protein kinase	41	CCGGCT	GGTTAA	645	1.81
At1g76410	RING finger protein	130	CCGGTA	GATTAA	1283	1.77
At2g33830	Dormancy/auxin associated protein	370	CCGGGA	TTTTAA	3106	1.75
At4g16000	Expressed protein	316	CCGGCC	TGTTAA	534	1.70
At3g59930	Expressed protein	39	CCGGCT	GGTTAA	4176	1.68
At1g30250	Expressed protein	81	CCGGTG	TTTTAA	685	1.62
At1g10470	Type-A response regulator ARR4	59	CCGGAT	CGTTAA	1150	1.60
At5g11420	Expressed protein	39	CCGGCT	ACTTAA	1451	1.60
At5g08690	ATP synthase beta-chain 2	53	CCGGCT	TATTAA	843	1.57
At2g05100	Chlorophyll A-B binding protein	151	CCGGGG	TCTTAA	860	1.56
At5g42450	Pentatricopeptide repeat protein	34	CCGGCC	TATTAA	1361	1.54
At3g55970	Putative oxidoreductase	89	CCGGAC	CGTTAA	1988	1.51
At5g13650	Elongation factor family protein	37	CCGGCC	TGTTAA	2601	1.51
At3g62930	Putative glutaredoxin	100	CCGGAG	CTTTAA	3481	1.50

^a HiCEP 解析によって検出された cDNA の配列にコードされている遺伝子の詳細を記載した。

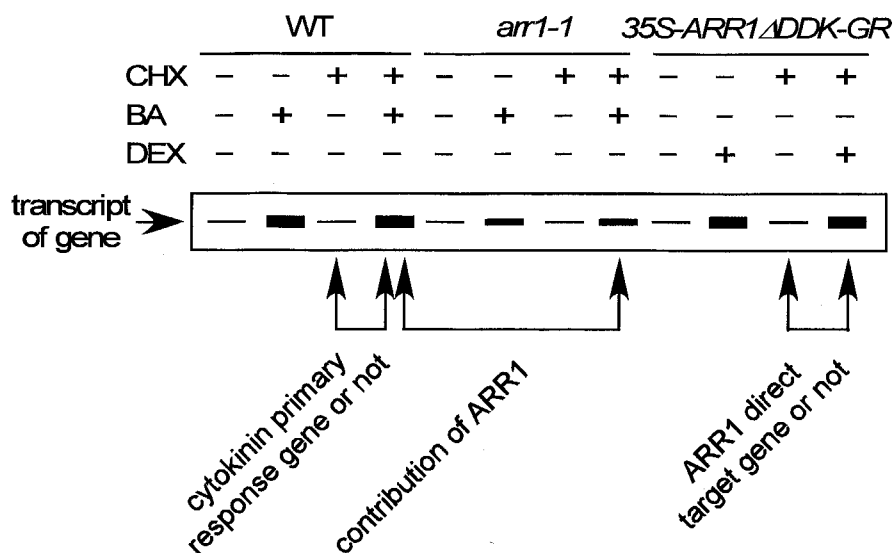
^b DEX 付加して抽出した tota RNA を用いて行った 2 回の HiCEP 解析で得られた低い方のピーク蛍光強度 (Lower DEX-treated Value) を示した。

^c DEX 付加して抽出した tota RNA を用いて行った 2 回の HiCEP 解析で得られた低い方のピーク蛍光強度 (Lower DEX-treated Value) を DEX の付加なしのときの高いほうのピーク蛍光強度 (higher DEX-untreated fluorescence levels) で割った値を示している。



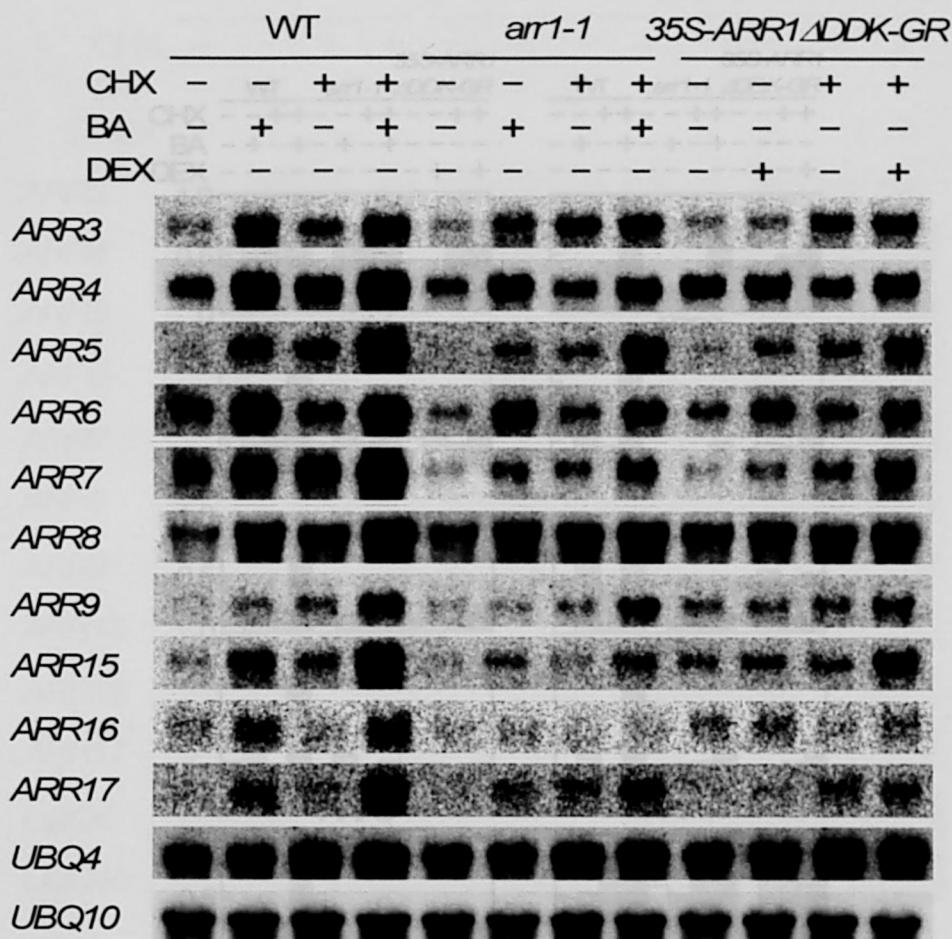
結果-図 1 グルコルチコイド受容体のホルモン結合ドメイン融合タンパク質の DEX による制御の模式図

グルコルチコイド受容体のホルモン結合ドメイン (GR-HBD) と融合させたタンパク質 X (protein X) の機能は、GR-HBD への hsp90 複合体 (hsp90 complex) の結合により阻害され不活性化されている。この状態でグルコルチコイドホルモンの一種である DEX を付加すると、GR-HBD の構造変化が起こり hsp90 複合体から解離して、タンパク質 X が活性化される (Picard et al., 1988; Picard, 1994)。



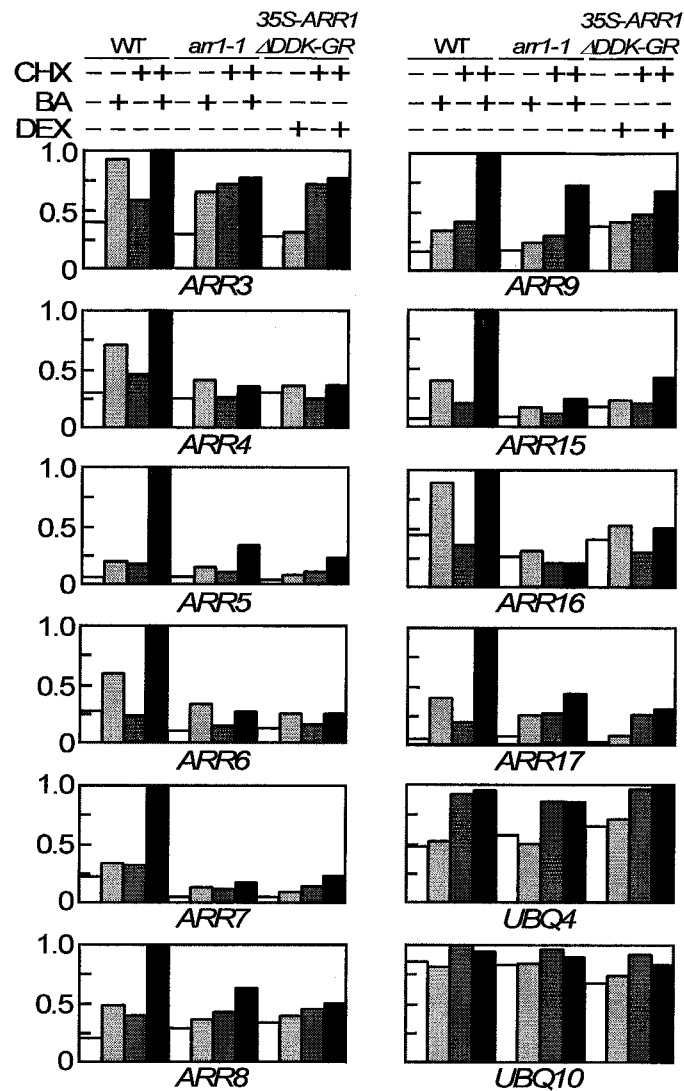
結果-図 2 ノザンブロット解析結果の判定方法

本研究で行ったノザンブロット解析の結果からそれぞれの遺伝子についてどのように判定を行ったかを模式的に示した。示した図は、WT 植物体および *arr1-1* 形質転換体には BA および CHX、*35S-ARR1/ADDK-GR* 形質転換体には DEX および CHX をそれぞれ組合せて付加し、所定時間時間処理したものから total RNA を抽出してノザンブロット解析を行った結果を想定した。これらの薬剤付加による様々な遺伝子のノザンブロット解析から、WT 植物体において CHX 付加によって新規のタンパク質合成を阻害した場合に BA 付加によって転写産物量の上昇する遺伝子はサイトカイニン初発応答遺伝子と判定し、*35S-ARR1/ADDK-GR* 形質転換体において DEX および CHX を共に付加することによって転写産物量の上昇する遺伝子は ARR1 のダイレクトターゲット遺伝子であると判定した。また、WT と *arr1-1* への BA および CHX の付加による遺伝子の転写発現の比較によってその遺伝子の転写活性化における ARR1 の寄与の程度を判定した。



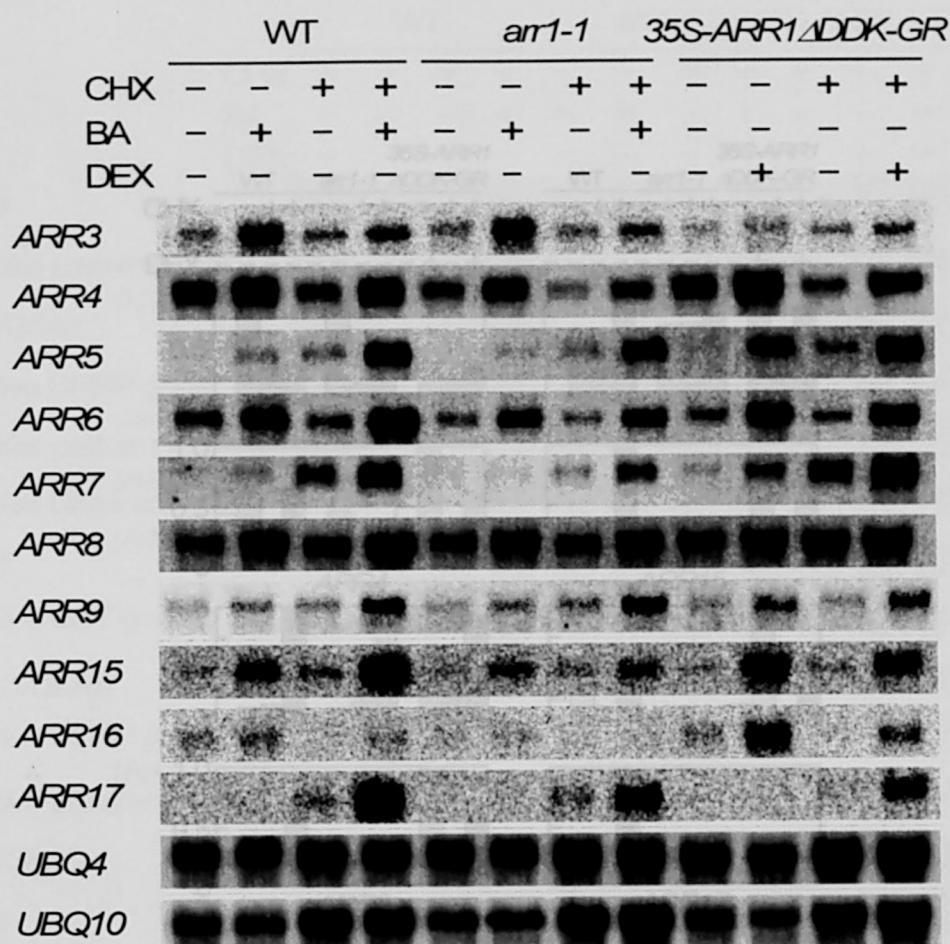
結果・図3 タイプA *ARR* 遺伝子のノザンブロット解析 (1時間)

タイプA *ARR* 遺伝子のサイトカイニン初発応答による転写活性化、および *ARR1* による直接的な転写活性化について調べるためにノザンブロット解析を行った。WT 植物体および *arr1-1* 形質転換体には 5 μ M BA および 30 μ M CHX、*35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体には 30 μ M DEX および 30 μ M CHX をそれぞれ組合せて付加し、各薬剤付加後 1 時間処理したもののから total RNA を抽出してノザンブロット解析に用いた。各レーンにはそれぞれ 6 μ g の total RNA を用いた。左側に用いたプローブの遺伝子名を記載した。シロイヌナズナのユビキチン遺伝子である *UBQ4* と *UBQ10* をネガティブコントロールとして用いた。尚、DEX 付加における *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体に対するコントロールとして、WT 植物体に DEX 付加を行い同様にノザンブロット解析を行った (結果・補足図 2、3)。



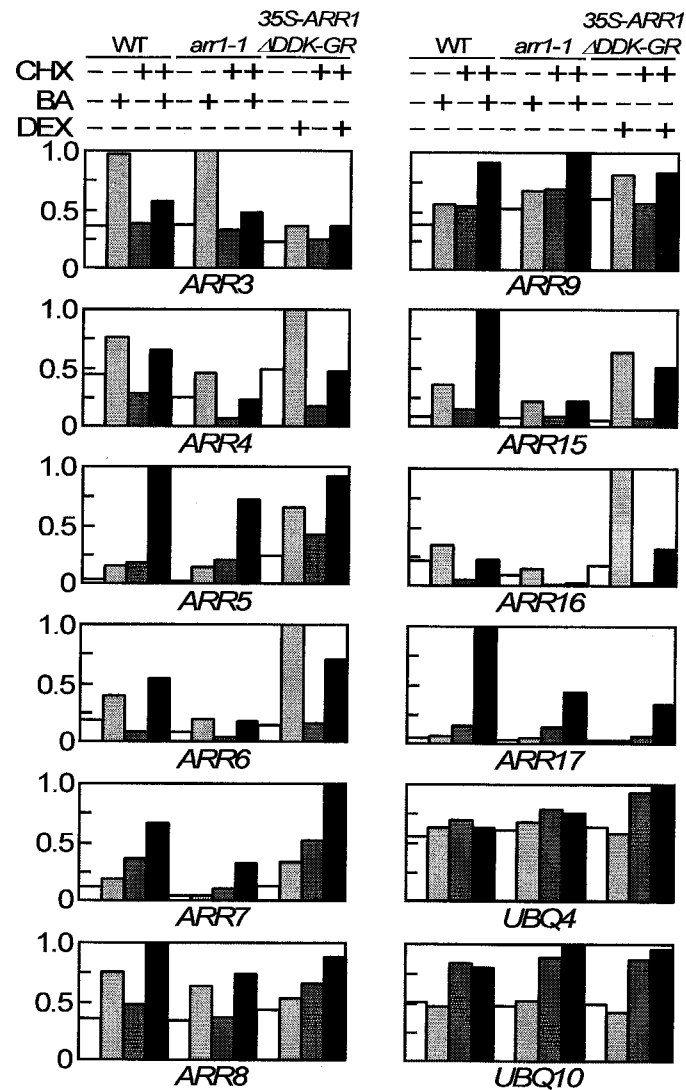
結果-図4 ノザン解析によるタイプA *ARR* 遺伝子の転写発現の定量 (1時間)

薬剤付加後1時間処理によるタイプA *ARR* 遺伝子の転写発現のノザンブロット解析結果 (結果-図3) から、各転写産物のバンドの黒化度をもとに定量を行った。各遺伝子の転写産物で最も強いバンドの値を1として、それに対する相対値をプロットした。



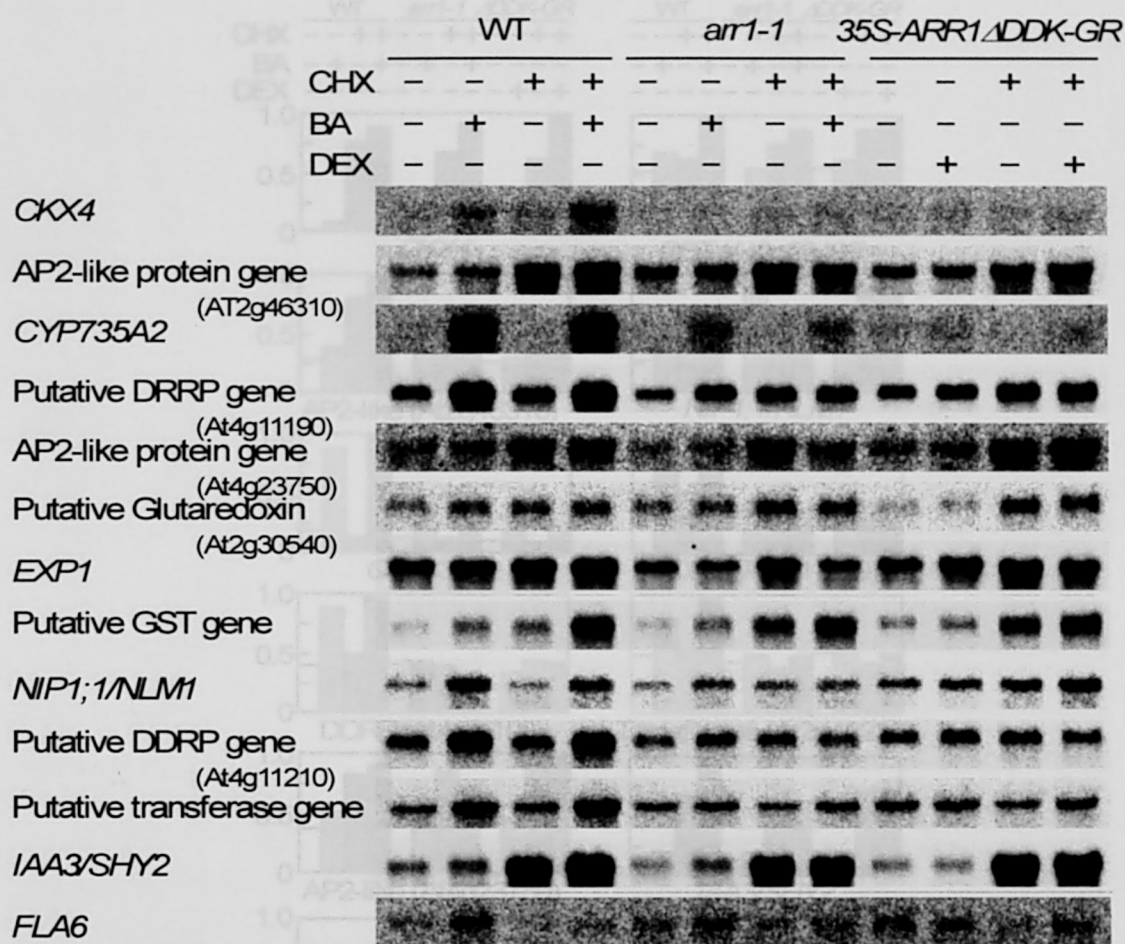
結果・図 5 タイプ A *ARR* 遺伝子のノザンブロット解析 (3 時間)

タイプ A *ARR* 遺伝子のサイトカイニン初発応答による転写活性化、および *ARR1* による直接的な転写活性化について調べるためにノザンブロット解析を行った。WT 植物体および *arr1-1* 形質転換体には 5μM BA および 30μM CHX、*35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体には 30μM DEX および 30μM CHX をそれぞれ組合せて付加し、各薬剤付加後 3 時間処理したものから total RNA を抽出してノザンブロット解析に用いた。各レーンにはそれぞれ 6μg の total RNA を用いた。左側に用いたプローブの遺伝子名を記載した。シロイヌナズナのユビキチン遺伝子である *UBQ4* と *UBQ10* をネガティブコントロールとして用いた。尚、DEX 付加における *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体に対するコントロールとして、WT 植物体に DEX 付加を行い同様にノザンブロット解析を行った (結果・補足図 2、3)。



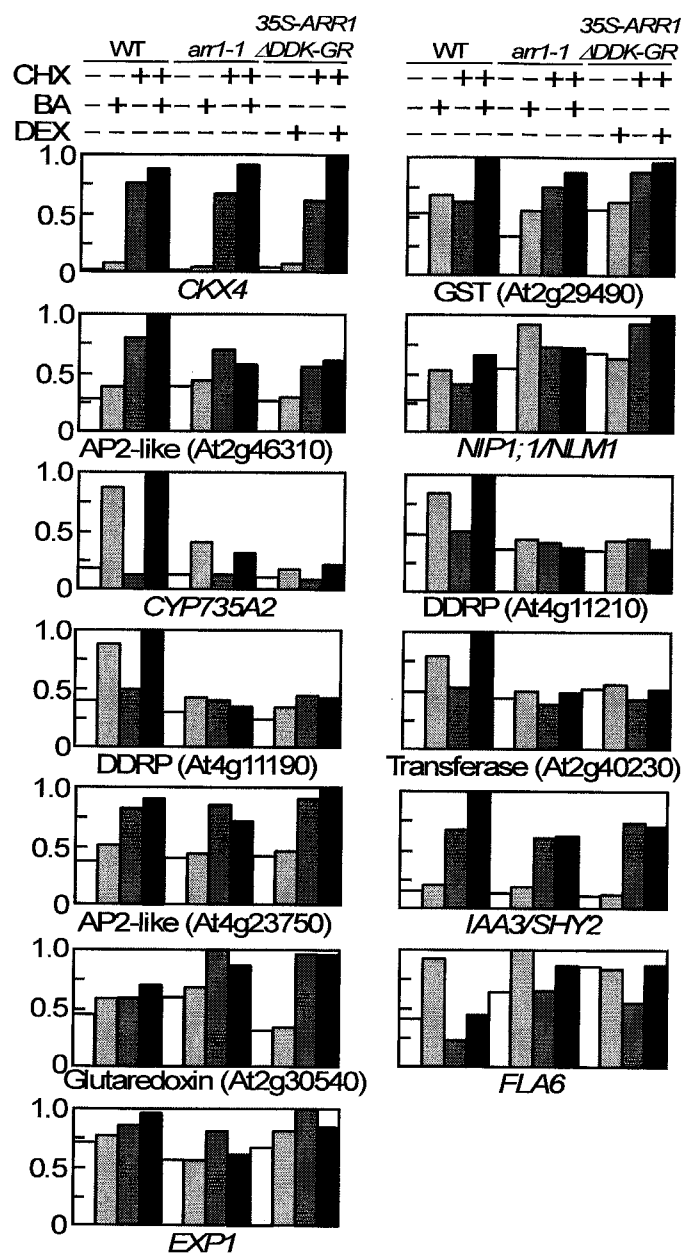
結果-図6 ノザン解析によるタイプA *ARR* 遺伝子の転写発現の定量 (3時間)

薬剤付加後3時間処理によるタイプA *ARR* 遺伝子の転写発現のノザンプロット解析結果 (結果-図5) から、各転写産物のバンドの黒化度をもとに定量を行った。各遺伝子の転写産物で最も強いバンドの値を1として、それに対する相対値をプロットした。



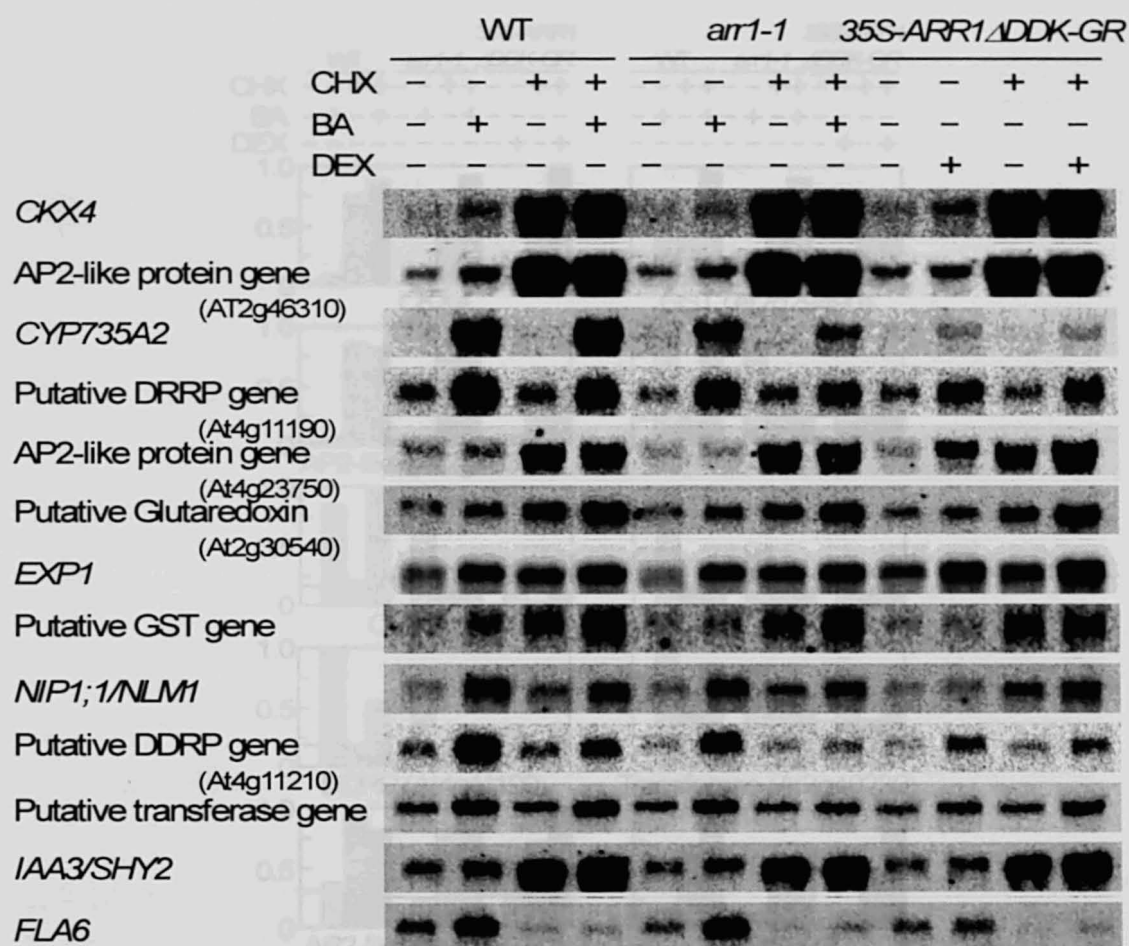
結果-図 7 タイプ A *ARR* 遺伝子を除くサイトカイニン応答遺伝子のノザンブロット解析 (1 時間)

タイプ A *ARR* 遺伝子を除くサイトカイニン応答遺伝子のサイトカイニン初発応答による転写活性化、および *ARR1* による直接的な転写活性化について調べるためにノザンブロット解析を行った。WT 植物体および *arr1-1* 形質転換体には 5μM BA および 30μM CHX、*35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体には 30μM DEX および 30μM CHX をそれぞれ組合せて付加し、各薬剤付加後 1 時間処理したものから total RNA を抽出してノザンブロット解析に用いた。各レーンにはそれぞれ 6μg の total RNA を用いた。左側に用いたプローブの遺伝子名、もしくは遺伝子のコードしているタンパク質名を記載した。薬剤付加後 1 時間の結果-図 1 と同様の total RNA を用いている為、*UBQ4* と *UBQ10* の結果は省いた。尚、DEX 付加における *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体に対するコントロールとして、WT 植物体に DEX 付加を行い同様にノザンブロット解析を行った (結果-補足図 4、5)。



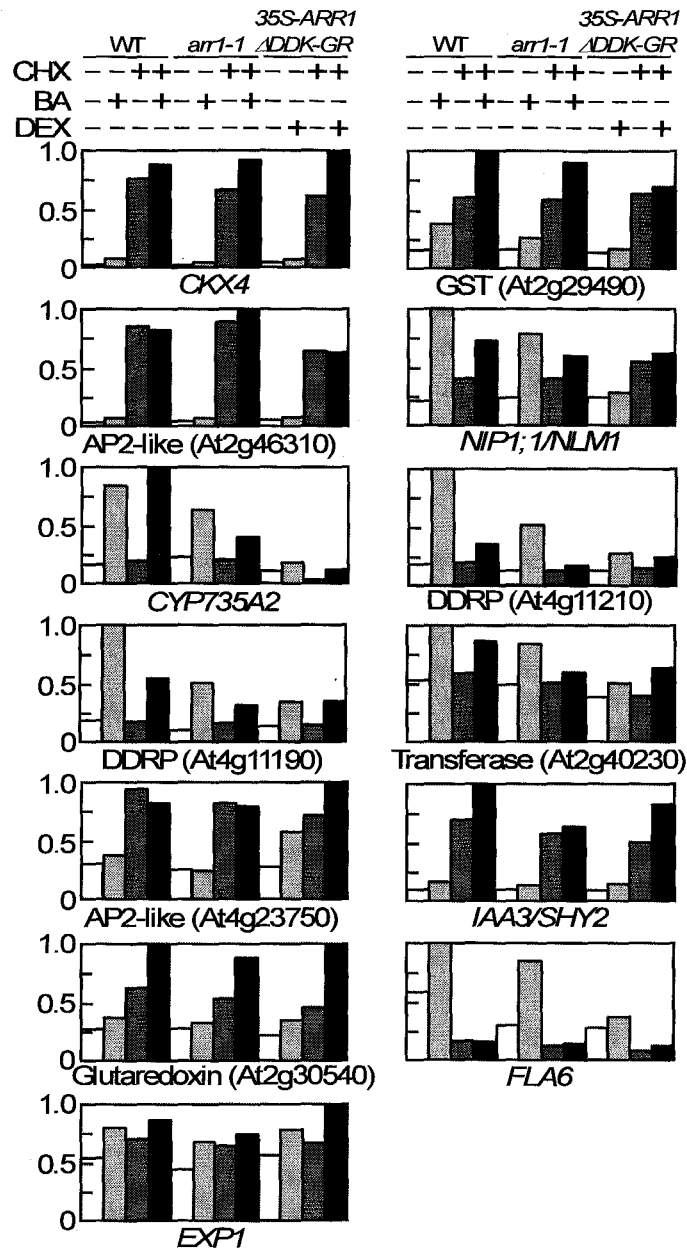
結果・図 8 ノザン解析によるタイプ A *ARR* 遺伝子を除くサイトカイニン応答遺伝子の転写発現の定量 (1 時間)

薬剤付加後 1 時間処理によるタイプ A *ARR* 遺伝子を除くサイトカイニン応答遺伝子の転写発現のノザンブロット解析結果 (結果・図 7) から、各転写産物のバンドの黒化度をもとに定量を行った。各遺伝子の転写産物で最も強いバンドの値を 1 として、それに対する相対値をプロットした。



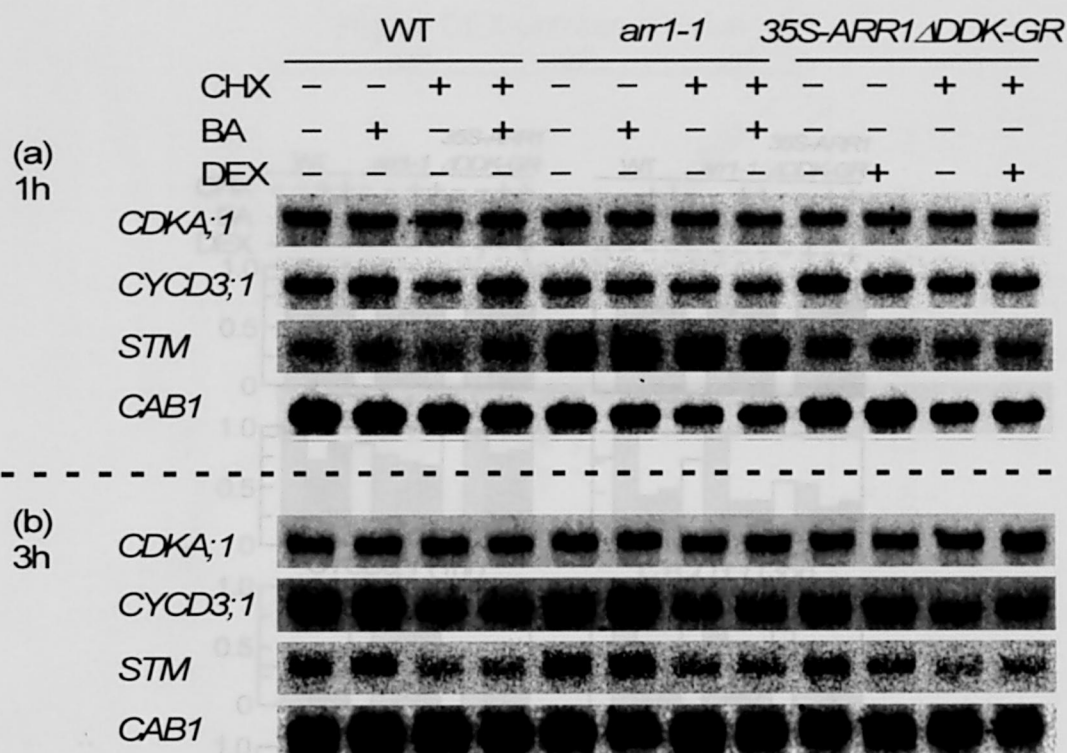
結果・図 9 タイプ A *ARR* 遺伝子を除くサイトカイニン応答遺伝子のノザンプロット解析 (3 時間)

タイプ A *ARR* 遺伝子を除くサイトカイニン初発応答による転写活性化、および *ARR1* による直接的な転写活性化について調べるためにノザンプロット解析を行った。WT 植物体および *arr1-1* 形質転換体には 5 μ M BA および 30 μ M CHX、*35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体には 30 μ M DEX および 30 μ M CHX をそれぞれ組合せて付加し、各薬剤付加後 3 時間処理したものから total RNA を抽出してノザンプロット解析に用いた。各レーンにはそれぞれ 6 μ g の total RNA を用いた。左側に用いたプローブの遺伝子名、もしくは遺伝子のコードしているタンパク質名を記載した。薬剤付加後 3 時間の結果・図 6 と同様の total RNA を用いている為、*UBQ4* と *UBQ10* の結果は省いた。尚、DEX 付加における *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体に対するコントロールとして、WT 植物体に DEX 付加を行い同様にノザンプロット解析を行った (結果・補足図 4、5)。



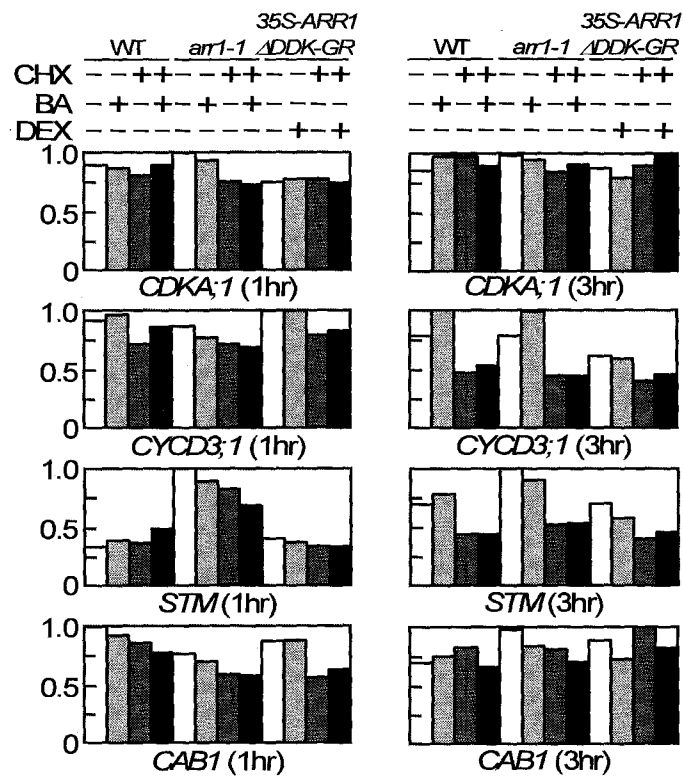
結果-図 10 ノザン解析によるタイプ A *ARR* 遺伝子を除くサイトカイニン応答遺伝子の転写発現の定量 (3 時間)

薬剤付加後 3 時間処理によるタイプ A *ARR* 遺伝子を除くサイトカイニン応答遺伝子の転写発現のノザンプロット解析結果 (結果-図 9) から、各転写産物のバンドの黒化度をもとに定量を行った。各遺伝子の転写産物で最も強いバンドの値を 1 として、それに対する相対値をプロットした。



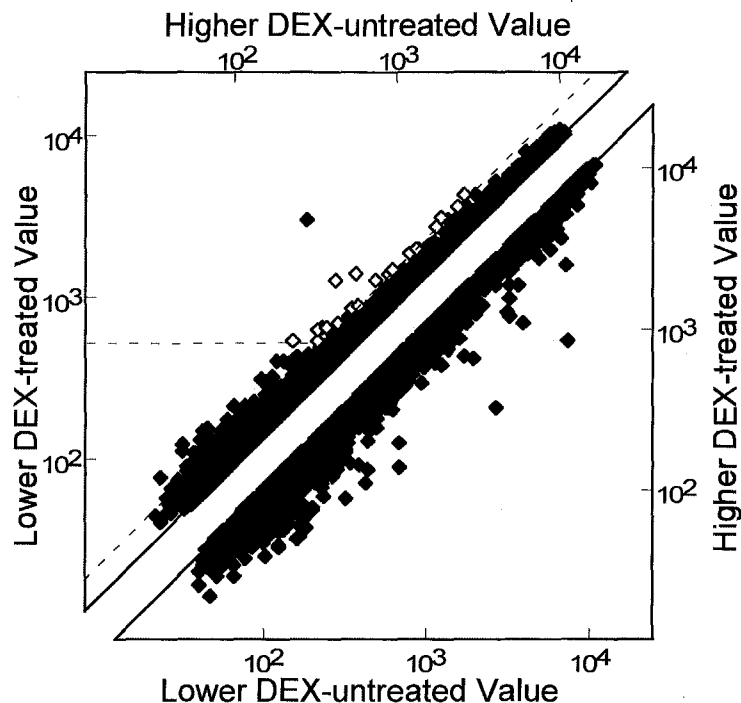
結果・図 11 サイトカイニンに応答して植物体の諸現象に関わる遺伝子転写発現の定量のノザンブロット解析

サイトカイニンに応答して植物体の諸現象に関わる遺伝子のサイトカイニン初発応答による転写活性化、および *ARR1* による直接的な転写活性化について調べるためにノザンブロット解析を行った。WT 植物体および *arr1-1* 形質転換体には 5μM BA および 30μM CHX、*35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体には 30μM DEX および 30μM CHX をそれぞれ組合せて付加し、各薬剤付加後 1 時間 (a) または 3 時間 (b) 処理したもののから total RNA を抽出してノザンブロット解析に用いた。また、各レーンにはそれぞれ 6μg の total RNA を用いた。左側に用いたプローブの遺伝子名、もしくは遺伝子のコードしているタンパク質名を記載した。薬剤付加後 1 時間および 3 時間の結果・図 3、5 と同様の total RNA を用いている為、*UBQ4* と *UBQ10* の結果は省いた。尚、DEX 付加における *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体に対するコントロールとして、WT 植物体に DEX 付加を行い同様にノザンブロット解析を行った (結果・補足図 6、7)。



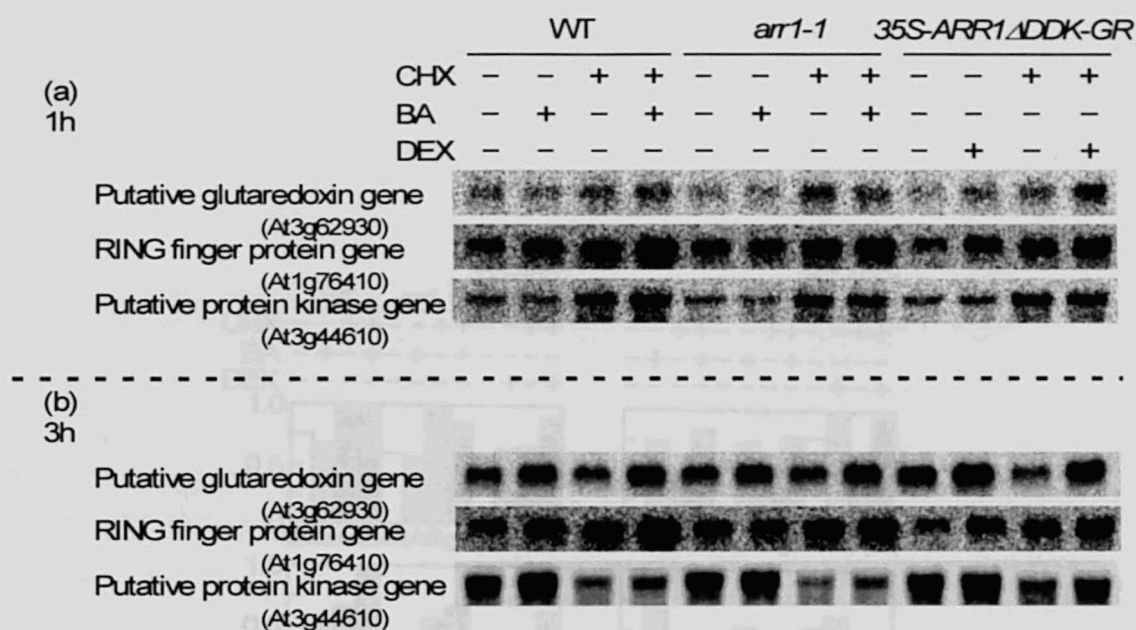
結果・図 12 サイトカイニンに応答して植物体の諸現象に関わる遺伝子転写発現の定量

薬剤付加後1時間または3時間処理によるサイトカイニンに応答して植物体の諸現象に関わる遺伝子の転写発現のノザンプロット解析結果（結果・図 11）から、各転写産物のバンドの黒化度をもとに定量を行った。各遺伝子の転写産物で最も強いバンドの値を1として、それに対する相対値をプロットした。



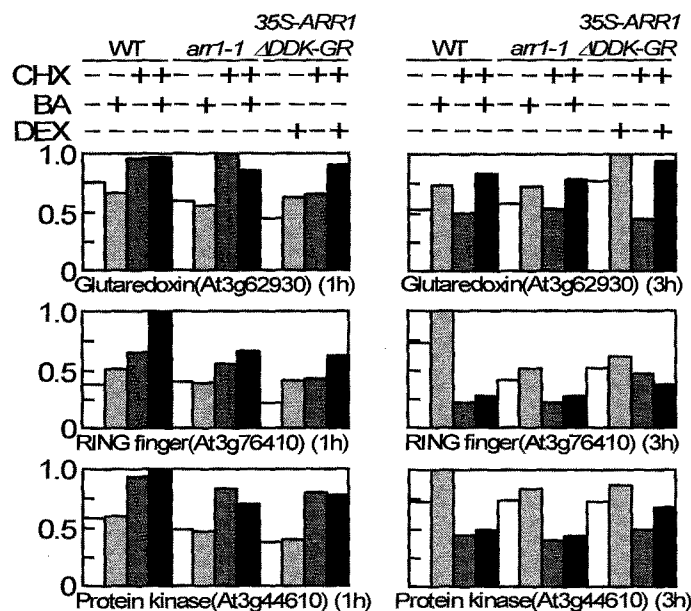
結論-図 13 HiCEP 解析で検出されたピークのスキャッタープロット

35S-ARR1ΔDDK-GR 形質転換植物体に DEX 付加の有無により 3 時間処理を行い、total RNA を抽出して各 2 回の HiCEP 解析を行った。DEX 付加して抽出した total RNA を用いて行った 2 回の解析のうち低い方のピーク蛍光強度 (Lower DEX-treated Value) が DEX 付加しないで抽出した total RNA を用いて行った 2 回の解析のうち高い方のピーク蛍光強度 (Higher DEX-untreated Value) より高かったものを左上のグラフにプロットした。また、それとは逆に DEX 付加して抽出した total RNA を用いて行った 2 回の解析のうち高い方のピーク蛍光強度 (Higher DEX-treated Value) が DEX 付加しないで抽出した total RNA を用いて行った 2 回の解析のうち低い方のピーク蛍光強度 (Lower DEX-untreated Value) より低かったものを右下のグラフにプロットした。水平に引いた破線は Lower DEX-treated Value の 500 のしきい値の境界を示し、斜めの破線は Lower DEX-treated Value と Higher DEX-untreated Value の 1.5 倍の閾値の境界を示している。グラフ中の白抜きのドットは、HiCEP 解析によって選抜された ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子の候補を示している。



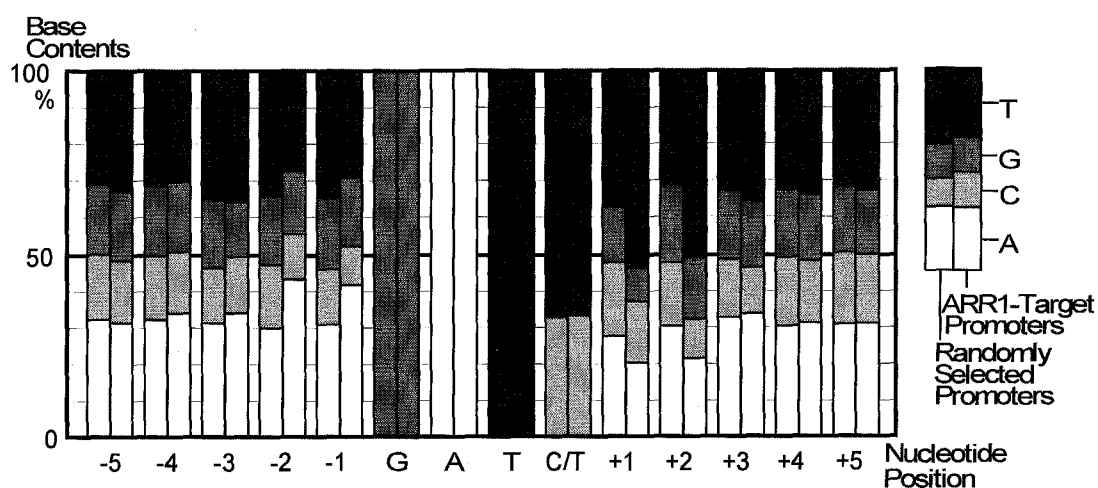
結果・図 14 HiCEP 解析により同定した ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のノザンブロット解析

HiCEP 解析により同定した ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のサイトカイニン初発応答による転写活性化、および ARR1 による直接的な転写活性化の影響について調べるためにノザンブロット解析を行った。WT 植物体および *arr1-1* 形質転換体には 5μM BA および 30μM CHX、*35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体には 30μM DEX および 30μM CHX をそれぞれ組合せて付加し、各薬剤付加後 1 時間 (a) または 3 時間 (b) 処理したものから total RNA を抽出してノザンブロット解析に用いた。また、各レーンにはそれぞれ 6μg の total RNA を用いた。左側に用いたプローブの遺伝子名、もしくは遺伝子のコードしているタンパク質名を記載した。薬剤付加後 1 時間および 3 時間の結果・図 2、3 と同様の total RNA を用いている為、*UBQ4* と *UBQ10* の結果は省いた。尚、DEX 付加における *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体に対するコントロールとして、WT 植物体に DEX 付加を行い同様にノザンブロット解析を行った (結果・補足図 6、7)。



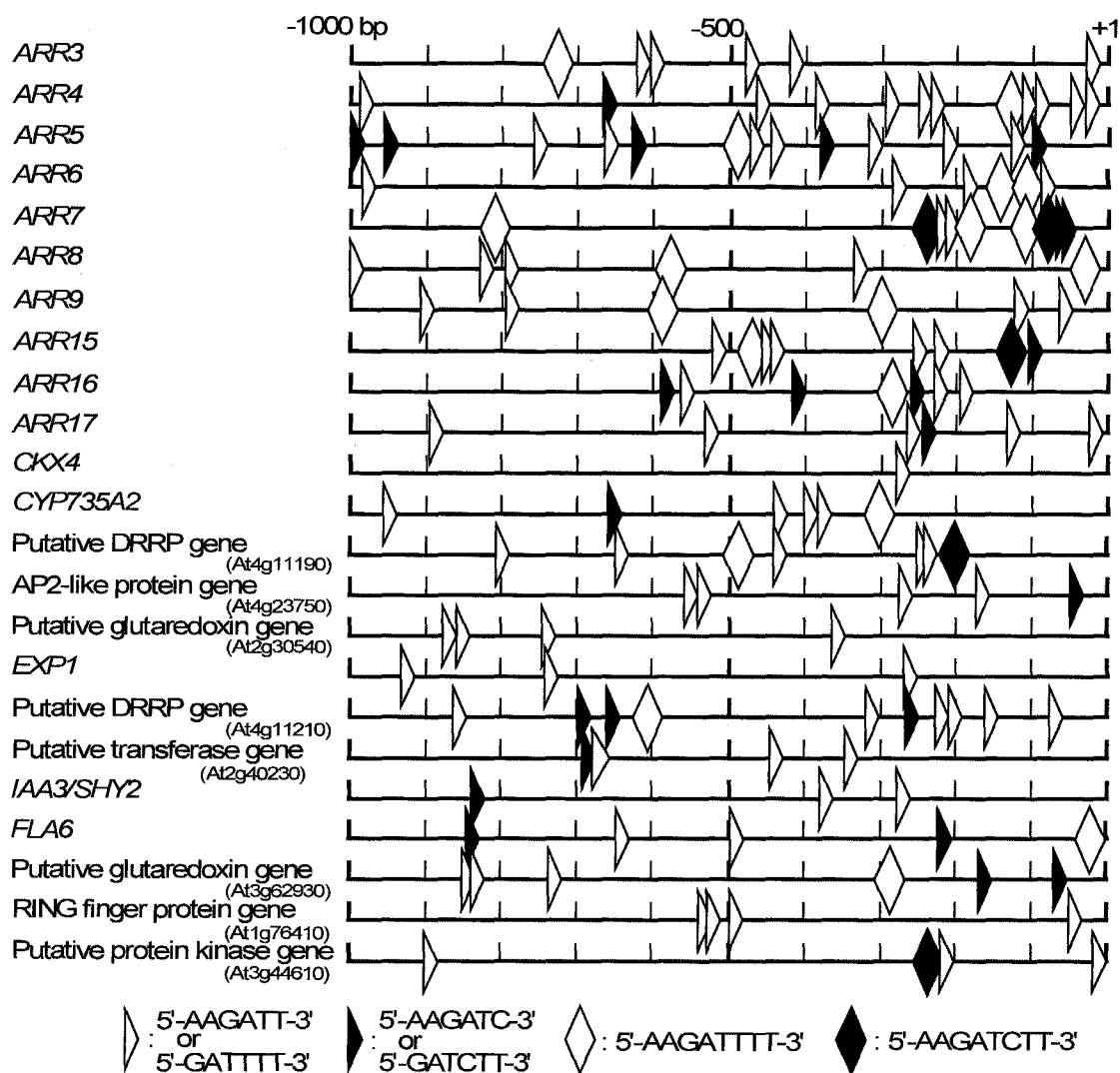
結果-図 15 HiCEP 解析により同定した ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子の転写発現の定量

薬剤付加後 1 時間または 3 時間処理による HiCEP 解析により同定した ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子の転写発現のノザンブロット解析結果（結果-図 14）から、各転写産物のバンドの黒化度をもとに定量を行った。各遺伝子の転写産物で最も強いバンドの値を 1 として、それに対する相対値をプロットした。



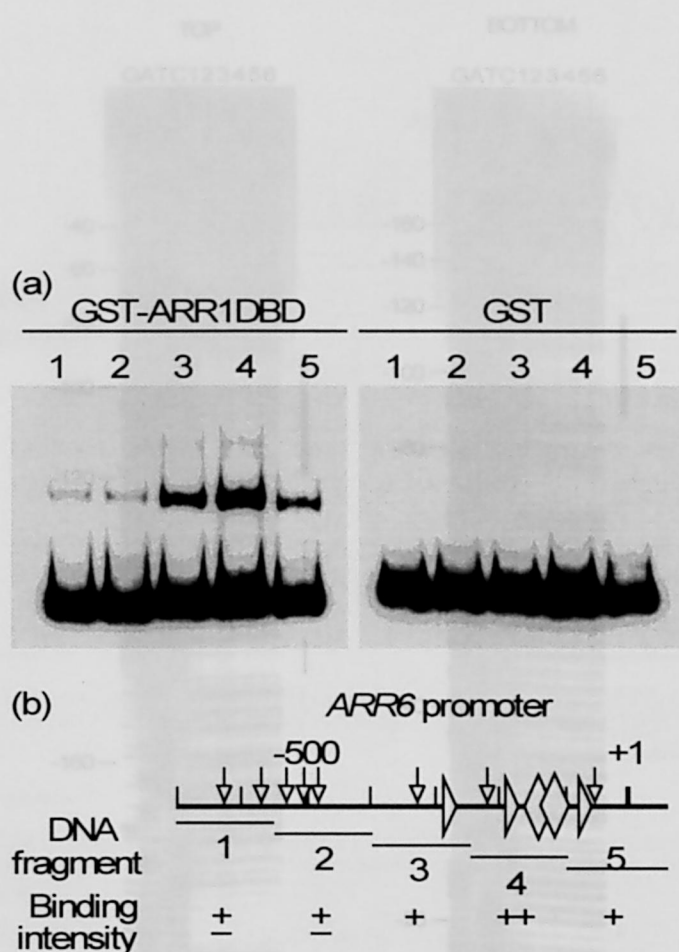
結果-図 16 本研究により同定した ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーターの特徴

本研究で同定した ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーターに存在する 5'-GAT(T/C)-3'の近傍の塩基配列の解析を行った。*in vitro*での ARR1 結合配列である 5'-GAT(T/C)-3'(Sakai et al., 2000)を本研究により同定した 23 遺伝子、および無作為に選抜した 500 遺伝子のプロモーターより抽出して、その近傍に存在する塩基配列を比較した。5'-GAT(T/C)-3'の近傍のそれぞれの位置に存在する塩基の割合を ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子は右に、無作為に選抜した 500 遺伝子は左に模式的に示した。



結果-図 17 本研究により同定した ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーターに存在する ARR1 結合配列の分布

本研究により同定した 23 の ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーターに存在する ARR1 結合配列の分布を示した。ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子の転写開始点上流 1,000bp に存在する各配列を 5'-AAGATT-3'および 5'-GATTTT-3'は白三角、5'-AAGATC-3'および 5'-GATCTT-3'は黒三角、5'-AAGATTTT-3'は白のひし形、5'-AAAAGATTTT-3'は黒のひし形で示した。

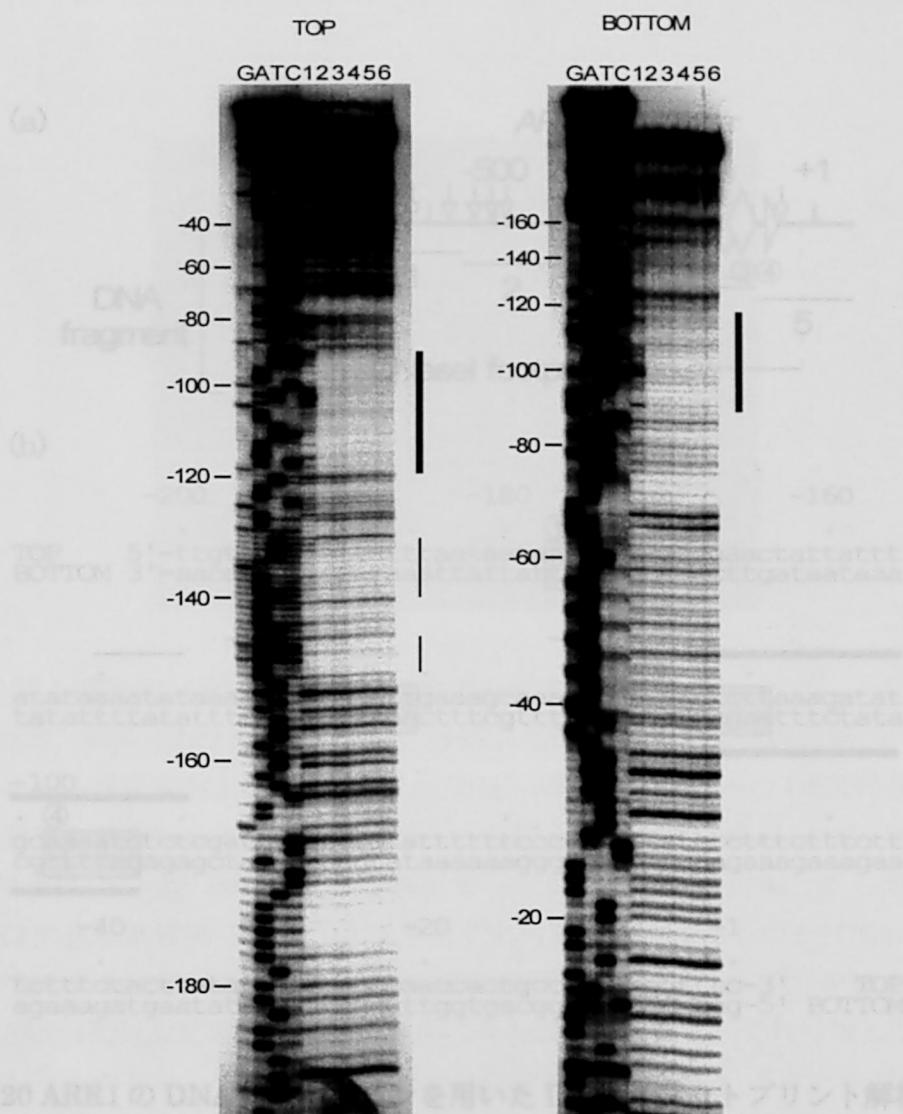


結果-図 18 ARR1 の DNA 結合ドメインを用いた *ARR6* プロモーター断片のゲルシフトアッセイ

(a) (b) に示した P-32 でラベルされた *ARR6* プロモーター断片 (1 から 5) と GST-ARR1DBD と GST を発現させた大腸菌の粗抽出画分を用いてゲルシフトアッセイを行った。

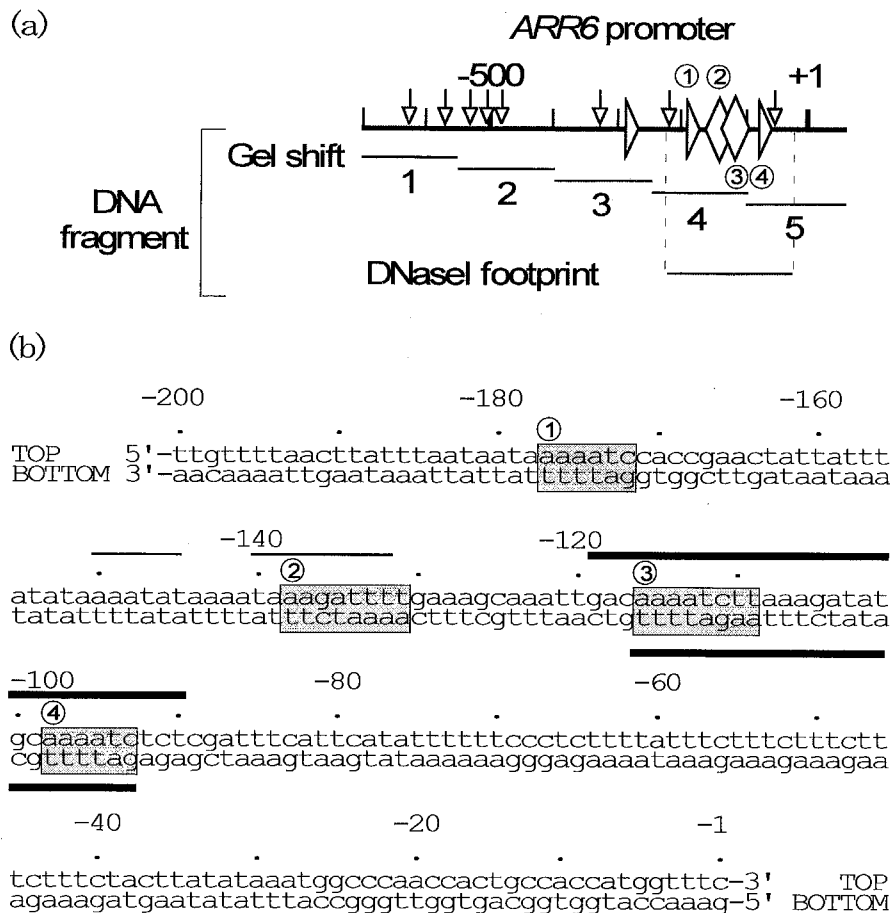
(b) GST-ARR1DBD と DNA 断片の結合の程度を「+」と「-」で示した。用いた *ARR6* プロモーターの DNA 断片の位置を模式図で示した。5'-GAT(T/C)-3'は垂直の矢印を用い、5'-GAT(T/C)TT-3'についても結果-図 17 と同様に白矢印とひし形を用いて示した。

図 18 上部に示した 1 から 5 までの数字は、DNA 断片 (0.15 pmol) に対して用いた GST-ARR1DBD タンパク質がそれぞれ 0, 3.15, 6.25, 12.5, 25, 50 pmol であったことと対応している。図 18 下部の模式図に示しているように、太い線は GST-ARR1DBD タンパク質によって強く DNA から保護された場所、それと比較して細い線は弱く保護された場所を示している。図 18 同時にシーケンスラダーを泳動しており、上部にヌクレオチド名を示した。また、シーケンスラダーの左の数字は *ARR6* 遺伝子の転写開始点を +1 としたときの場所を示している。



結果・図 19 ARR1 の DNA 結合ドメインを用いた DNaseI フットプリント解析

精製した GST-ARR1DBD タンパク質を用いて、*ARR6* プロモーターDNA の部分断片に対する DNaseI フットプリント解析を行った。この図は、電気泳動後のアクリルアミドゲルに対するオートラジオグラフィーの像を示しており、左右それぞれプラス鎖 (TOP) およびマイナス鎖 (BOTTOM) の結果である。プラス鎖およびマイナス鎖の泳動像上部に示した 1 から 6 までの数字は、DNA 断片 (0.15pmol) に対して用いた GST-ARR1DBD タンパク質がそれぞれ 0、3.15、6.25、12.5、25、50pmol であったことと対応している。各泳動像の右側に示している線について、太い線は GST-ARR1DBD タンパク質によって強く DNaseI から保護された場所、それに比較して細い線は弱く保護された場所を示している。尚、同時にシーケンスラダーを泳動しており、上部にヌクレオチド名を示した。また、シーケンスラダーの左の数字は *ARR6* 遺伝子の転写開始点を+1 としたときの場所を示している。



結果-図 20 *ARR1* の DNA 結合ドメインを用いた DNaseI フットプリント解析のまとめ

(a) 結果-図 18 の (a) で用いた模式図と同様のものに、DNaseI フットプリント解析に用いた *ARR6* プロモーター断片の場所を示した。5'-GAT(T/C)-3'は垂直の矢印を用い、5'-GAT(T/C)TT-3'についても結果-図 17 と同様に白矢印とひし形を用いて示しており、この中で DNaseI フットプリント解析に用いた DNA 断片に含まれるものには①から④までの番号を付した。

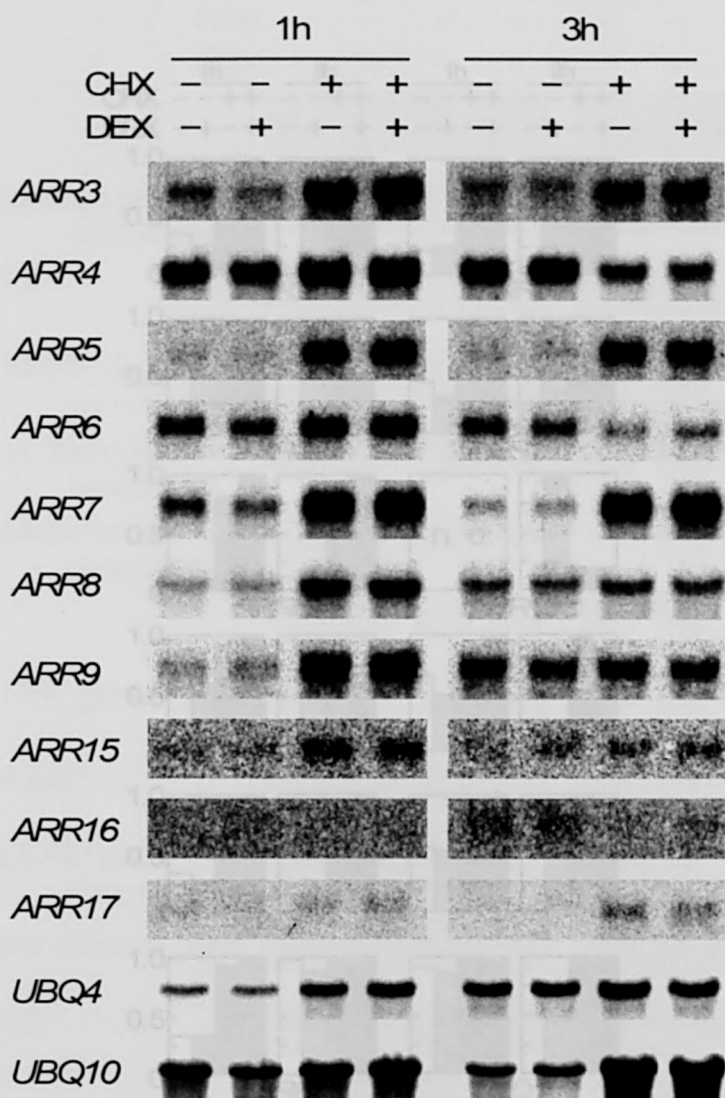
(b) 結果-図 20 の (a) に示した DNaseI フットプリント解析の結果をまとめた。*ARR6* プロモーターの -1 から -200 までの DNA 配列に対して、結果-図で太い線および細い線で示した GST-ARR1DBD タンパク質によって DNaseI から保護されている場所を対応させた。尚、①から④までの番号を付けた四角で囲んだ配列は (a) の模式図と対応している。また、DNA 配列の上側はプラス鎖、下側はマイナス鎖を示している。



結果・補足図 1 様々な ARR1 形質転換植物体の示す表現形

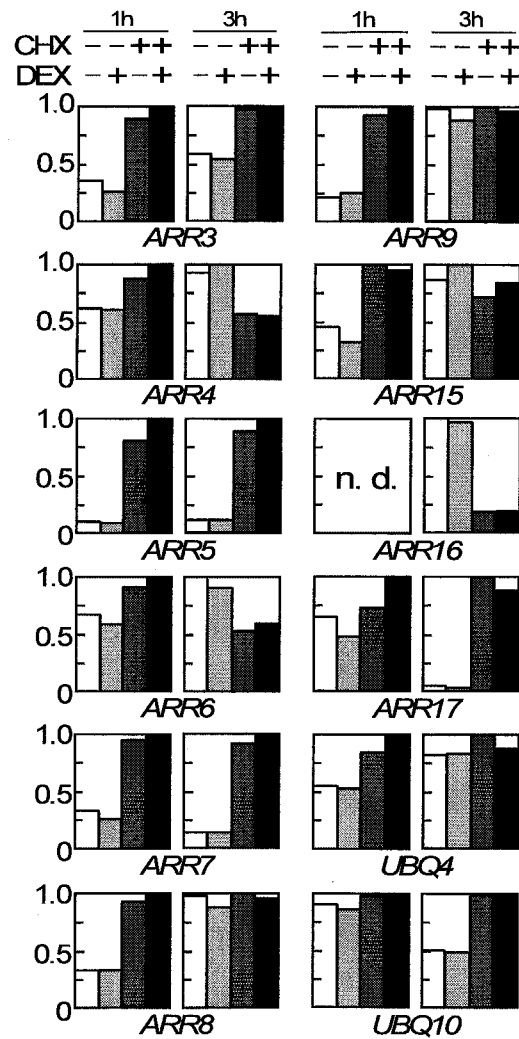
WT 植物体、*35S-ARR1* 形質転換植物、*35S-ARR1ΔDDK* 形質転換植物への BA 付加により示される表現形および *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体への DEX 付加により示される表現形を示すために Sakai らの研究から図を抜粋した(Sakai et al., 2001)。(a、e) WT 植物体に 1μM BA をそれぞれ付加しなかったものと付加したもの；(b、f) *35S-ARR1* 形質転換植物に 1μM BA をそれぞれ付加しなかったものと付加したもの；(c、d) BA 付加を行わなかった *35S-ARR1ΔDDK* 形質転換植物；(g) (f) を拡大したもの；(h、i) *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体に 0.1μM DEX をそれぞれ付加しなかったものと付加したものを示している。尚、図中の矢印は子葉を示し、スケールバーは 1mm を示している。

解説：シロイヌナズナの WT 植物体を BA の付加した状態で生育させると、著しい生育阻害が見られる (e)。このような表現型が、ARR1 の過剰発現体である *35S-ARR1* 形質転換体においては、BA 付加時の生育阻害が助長される (f、g)。BA の制御を必要としない、恒常的転写活性化能をもつ *ARR1ΔDDK* を過剰発現する *35S-ARR1ΔDDK* 形質転換体は、BA 付加に依存せず生育阻害が誘導される (c、d)。この生育阻害は、WT 植物体に BA を付加したときに見られる表現型よりも強い。この *ARR1ΔDDK* の転写活性化能をグルココルチコイド依存的に人為的に制御できる *ARR1ΔDDK-GR* タンパク質を発現する *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体は、DEX 未付加の場合には通常に生育させた WT 植物体と変わらない表現型であるが (h)、DEX 付加時には *35S-ARR1ΔDDK* 形質転換体と同様な表現型を示す (i)。



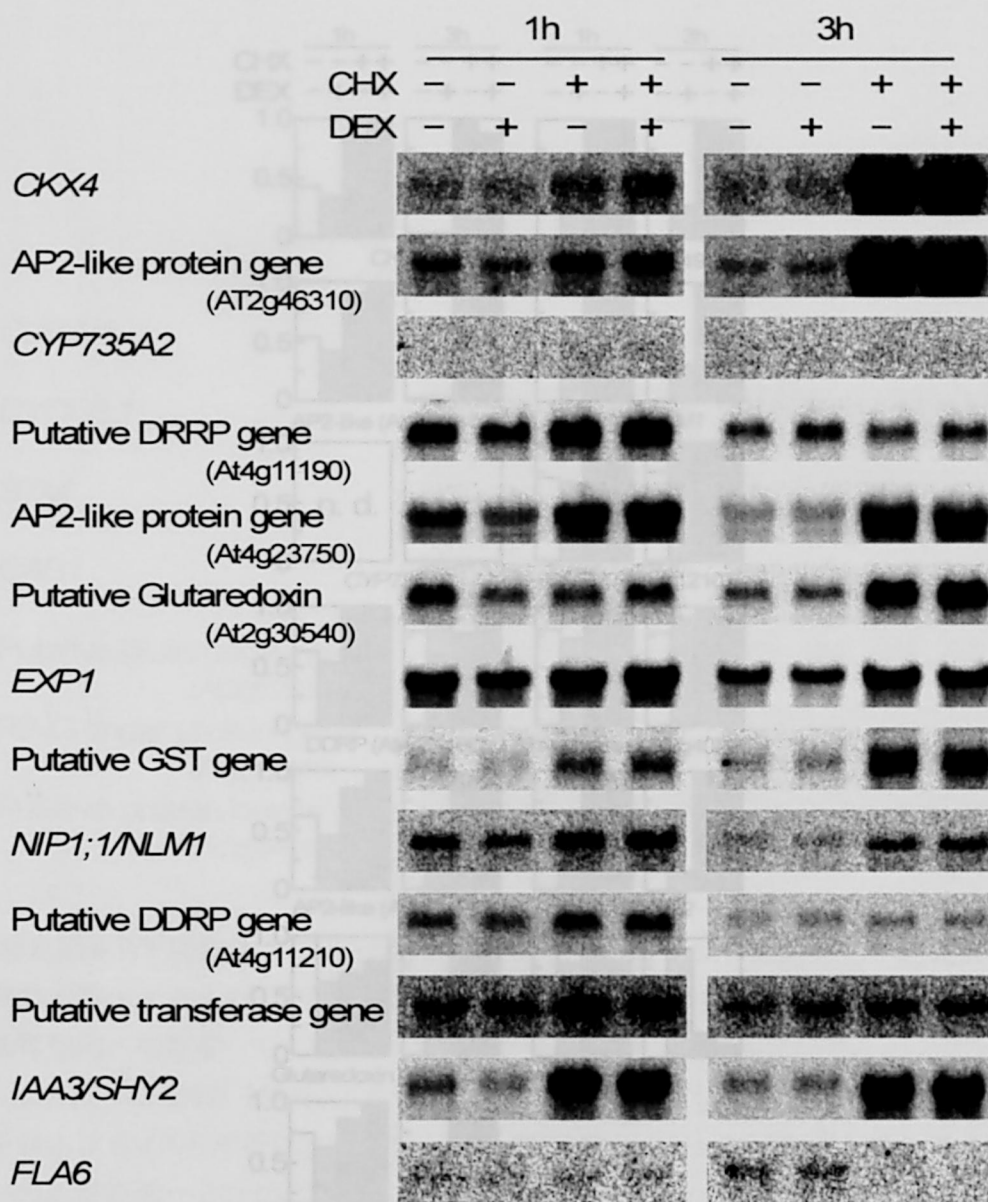
結果-補足図 2 WT 植物体への DEX 付加によるタイプ A *ARR* 遺伝子の転写発現への影響

WT 植物体への DEX 付加によるタイプ A *ARR* 遺伝子の転写産物量への影響を調べるためにノザンブロット解析を行った。WT 植物体に 30 μ M DEX および 30 μ M CHX をそれぞれ組合せて付加し、各薬剤付加後 1 時間または 3 時間処理したものから total RNA を抽出してノザンブロット解析に用いた。また、各レーンにはそれぞれ 6 μ g の total RNA を用いた。左側に用いたプローブの遺伝子名を記載した。



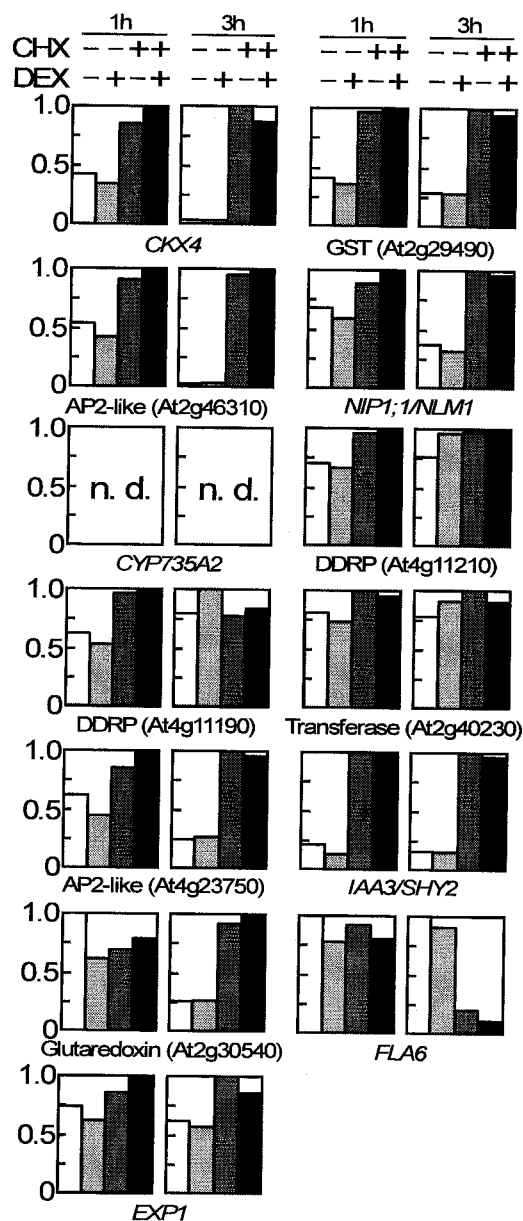
結果-補足図 3 WT 植物体への DEX 付加によるタイプ A *ARR* 遺伝子の転写発現の定量

WT 植物体への DEX 付加後 1 時間または 3 時間処理によるタイプ A *ARR* 遺伝子の転写発現のノザンブロット解析結果 (結果-補足図 2) から、各転写産物のバンドの黒化度をもとに定量を行った。各遺伝子の転写産物で最も強いバンドの値を 1 として、それに対する相対値をプロットした。



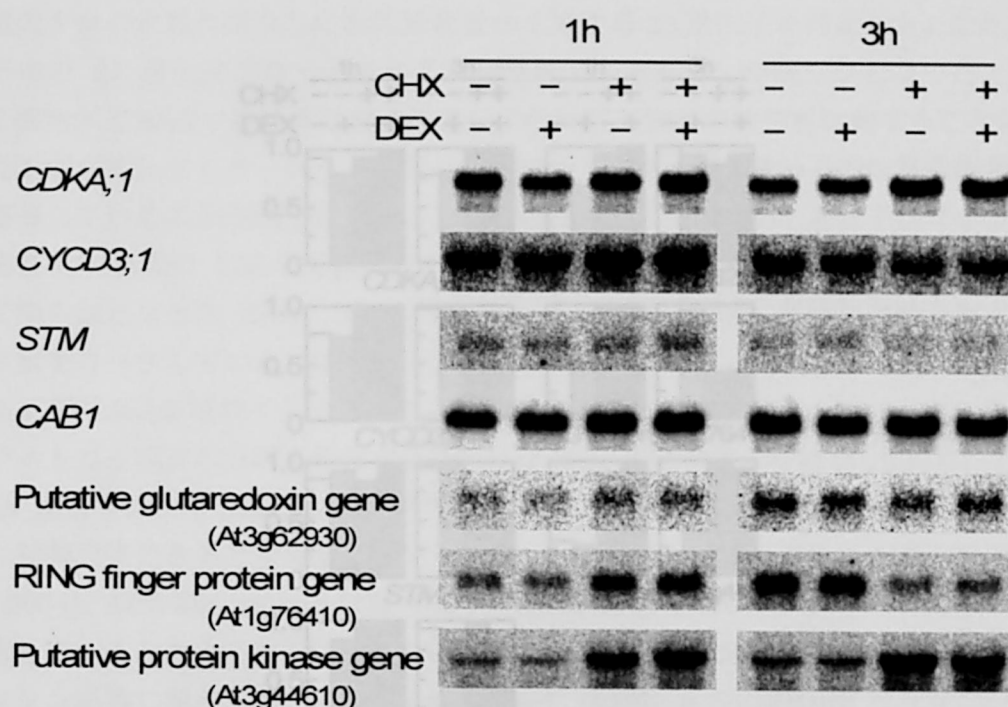
結果・補足図 4 WT 植物体への DEX 付加によるタイプ A *ARR* 遺伝子を除くサイトカイニン応答遺伝子の転写発現への影響

WT 植物体への DEX 付加によるタイプ A *ARR* 遺伝子を除くサイトカイニン応答遺伝子の転写産物量への影響を調べるためにノザンブロット解析を行った。WT 植物体に 30 μ M DEX および 30 μ M CHX をそれぞれ組合せて付加し、各薬剤付加後 1 時間または 3 時間処理したものから total RNA を抽出してノザンブロット解析に用いた。また、各レーンにはそれぞれ 6 μ g の total RNA を用いた。の左側に用いたプローブの遺伝子名、もしくは遺伝子のコードしているタンパク質名を記載した。



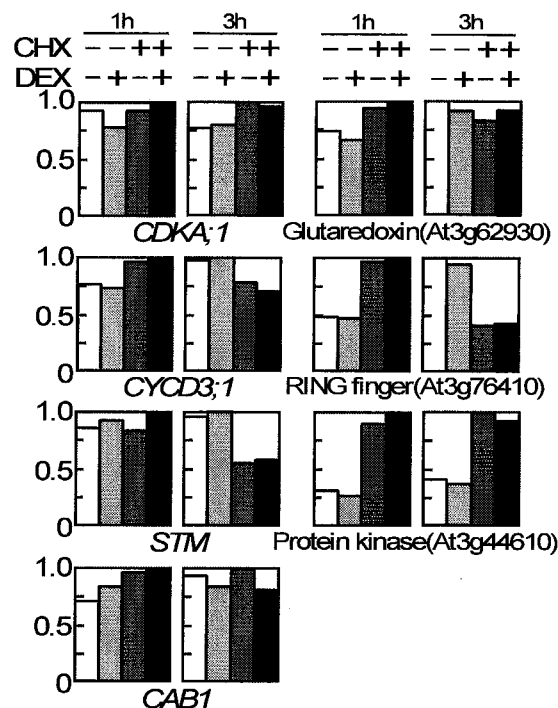
結果-補足図 5 WT 植物体への DEX 付加によるタイプ A *ARR* 遺伝子を除くサイトカイニン応答遺伝子の転写発現の定量

WT 植物体への DEX 付加後 1 時間または 3 時間処理によるタイプ A *ARR* 遺伝子を除くサイトカイニン応答遺伝子の転写発現のノザンプロット解析結果 (結果-補足図 4) から、各転写産物のバンドの黒化度をもとに定量を行った。各遺伝子の転写産物で最も強いバンドの値を 1 として、それに対する相対値をプロットした。



結果・補足図6 WT植物体へのDEX付加によるサイトカイニンに応答して植物体の諸現象に関わる遺伝子およびHiCEP解析により同定したARR1ダイレクトターゲット遺伝子の転写発現への影響

WT植物体へのDEX付加によるサイトカイニンに応答して植物体の諸現象に関わる遺伝子およびHiCEP解析により同定したARR1ダイレクトターゲット遺伝子の転写産物量への影響を調べるためにノザンブロット解析を行った。WT植物体に30 μ M DEXおよび30 μ M CHXをそれぞれ組合せて付加し、各薬剤付加後1時間または3時間処理したものからtotal RNAを抽出してノザンブロット解析に用いた。また、各レーンにはそれぞれ6 μ gのtotal RNAを用いた。の左側に用いたプローブの遺伝子名、もしくは遺伝子のコードしているタンパク質名を記載した。



結果-補足図7 WT植物体へのDEX付加によるサイトカイニンに応答して植物体の諸現象に関わる遺伝子およびHiCEP解析により同定したARR1ダイレクトターゲット遺伝子の転写発現の定量

WT植物体へのDEX付加後1時間または3時間処理によるサイトカイニンに応答して植物体の諸現象に関わる遺伝子およびHiCEP解析により同定したARR1ダイレクトターゲット遺伝子の転写発現のノザンプロット解析結果(結果-補足図6)から、各転写産物のバンドの黒化度をもとに定量を行った。各遺伝子の転写産物で最も強いバンドの値を1として、それに対する相対値をプロットした。

第四章 考察

1. ARR1 によるダイレクトターゲット遺伝子の転写制御

本研究では ARR1 のダイレクトターゲット遺伝子として、ARR1ΔDDK-GR によって新規のタンパク質合成なしに転写産物量が上昇する 23 遺伝子を同定した。また、23 遺伝子中の 21 遺伝子がサイトカイニン初発遺伝子あることが明らかとなった。さらに WT 植物体と *arr1-1* 変異体における遺伝子の転写産物量の増加を比較することにより、ARR1 がダイレクトターゲット遺伝子の中で少なくとも 17 遺伝子の転写産物量の増加に寄与していることが明らかとなった。このことは、それら 17 遺伝子がサイトカイニン応答時に ARR1 によって直接転写活性化されていることを示している。このようにして明らかとなった ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子は、多様な機能を有するタンパク質をコードしていた。以下にそれら機能を列記すると、cytokinin hydroxylase である CYP735A2 はサイトカイニンの合成を触媒し、cytokinin oxidase である CKX4 はサイトカイニンの分解を触媒する(Werner et al., 2001; Takei et al., 2004)。タイプ A ARR 遺伝子は、リン酸リレーシグナルの出力装置であり、サイトカイニンシグナルの負の制御因子であると考えられている(Imamura et al., 1999; Kiba et al., 2003; To et al., 2004)。AP2-like protein は転写因子であり、おそらくサイトカイニン直下の転写を促進していると考えられる。IAA3/SHY2 は、重力屈性や側根形成などの根におけるオーキシン応答に関与している(Tian and Reed, 1999)。2 つの DDRP はリグニンやリグナンの生合成に関わるタンパク質をコードしており、細胞外基質の再構成を行っていると考えられている(Gang et al., 1999)。ARR1 が受け取ったサイトカイニンシグナルは、このような様々な ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子によってサイトカイニン応答時に起こる植物個体の現象の制御に関わっている。

本研究においてサイトカイニン初発応答遺伝子のほとんどは、ARR1 のダイレクトターゲットであることが明らかとなった。このことから、ARR1 や ARR1 と類似した分子機能を有するタイプ B ARR が(Sakai et al., 2000; Lohrmann et al., 2001; Hosoda et al., 2002; Imamura et al., 2003)、ほとんどのサイトカイニン初発応答遺伝子の転写制御を行っていることが示唆される。サイトカイニン初発応答遺伝子である glutathione-S-transferase 遺伝子 (At2g29490) や *NI1;1/NLM1* は、ARR1ΔDDK-GR によって転写活性化されなかったが、これらについては ARR1 以外の因子によって転写活性化されていると考えられる。AP2-like transcription factor 遺伝子 (At4g23750) と putative protein kinase 遺伝子 (At3g44610) は ARR1ΔDDK-GR の転写活性化能の誘導によって転写産物量が増加したが、WT 植物へ CHX 付加を伴った BA 付加によってはそれら遺伝子の転写産物量の増加はみられなかった。Rashotte らの報告(Rashotte et al., 2003)および本研究のどちらにおいてもそれらの遺伝子は CHX 付加を

伴わないときに BA 付加によって転写産物量が増加すること、および ARR1 のダイレクトターゲット遺伝子であることから、CHX 付加時のサイトカイニン応答が検出できなかっただけで、実際にはサイトカイニン初発応答遺伝子である可能性は残されている。

putative protein kinase 遺伝子を除く ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子は、これまでに報告された遺伝子発現解析においてサイトカイニンに早期に応答する遺伝子であることが示されている(Hoth et al., 2003; Rashotte et al., 2003; Kiba et al., 2004; Brenner et al., 2005)。一方、比較的長い時間を要してサイトカイニン応答を行う *CDKA;1* や *STM* は ARR1ΔDDK-GR の転写活性化能誘導後 1 時間または 3 時間では転写産物量が増加しなかった。このことは、ARR1 がサイトカイニンの初発応答に関わっていることと辻褃が合う。*CYCD3;1* 遺伝子の転写活性化には、サイトカイニン応答による新規のタンパク質合成を伴わないことが報告されている(Riou-Khamlichi et al., 1999)。しかし、本研究ではこの遺伝子の転写活性化は CHX 付加を伴わない BA 付加時に確認されたのみで、DEX を付加した *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体ではそのような転写産物量の増加はみられなかった。*CYCD3;1* 遺伝子のサイトカイニン初発応答における転写活性化には ARR1 以外の何か他の因子が関わっている可能性が考えられる。

WT 植物体と *arr1-1* 変異体のサイトカイニン応答の比較によって、ARR1 によるダイレクトターゲット遺伝子の転写活性化への寄与の程度が多様であることが明らかとなった。このことから、ターゲット遺伝子によって転写活性化に関わるタイプ B ARR のそれぞれの寄与の程度が異なっている可能性が考えられる。また、いくつかのタイプ B ARR は ARR1 とは微妙に異なる配列選択性を有しており(Imamura et al., 2003)、このことが転写活性化に対する寄与の違いにつながっているのかも知れない。最近の研究で、*ARR1*、*ARR10*、*ARR12* のタイプ B ARR 遺伝子三重変異体では、本研究で行ったノザンプロット解析において *arr1-1* 変異体でほとんど変化がなかった *ARR3* や *ARR9* のサイトカイニン応答に大きな影響がみられている(Mason et al., 2005)。これらの事実は、サイトカイニン応答遺伝子が一つ以上のタイプ B ARR によって制御されており、それらタイプ B ARR の寄与の程度はそれぞれの遺伝子によって異なることを示している。また、ARR1 のダイレクトターゲットではないとされた putative glutathione-S-transferase 遺伝子や *NIP1;1/NLM1* についても ARR1 以外のタイプ B ARR によって転写量を増加されている可能性がある。最近の報告において、AP2 転写因子である CRF が早期のサイトカイニン応答における遺伝子の転写活性化に関与していることが示された(Rashotte et al., 2006)。この転写因子は、本研究で解析したいくつかの遺伝子のサイトカイニン初発応答に影響を及ぼしているかもしれない。

2. HiCEP 解析による ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のスクリーニング

HiCEP 解析によって選抜した ARR1ΔDDK-GR の転写活性化能の誘導 によって転写産物量が上昇する 18 の ARR1 ダイレクトターゲット候補遺伝子のうち、13 遺伝子についてはノザンプロット解析で再現性が確認出来なかった。また、いくつかの候補遺伝子についてはノザンプロット解析によって検出できず、これはノザンプロット解析による検出感度が HiCEP よりも低いためであると考えられた。また、ノザンプロット解析は完全長の mRNA を、それに対して HiCEP は cDNA の断片を検出しており、不安定な mRNA を対象とした場合には二つの方法から異なる結果が示される可能性が予測される。これらのことから再現性の確認できなかった 13 遺伝子には、ARR1 のダイレクトターゲットが含まれている可能性が残されている。

本研究では、ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のスクリーニングのために、HiCEP 解析以外の方法としてマイクロアレイ解析も行った。そのマイクロアレイ解析ではアラビドプシスの 24,000 遺伝子についてスクリーニングを行うことが出来る。ARR1ΔDDK-GR の転写活性化能を DEX 付加後 1 時間誘導したときに転写産物量が増加する遺伝子の探索を行った。その結果、様々な遺伝子の転写量の変化が観察された(考察-図 1)。ARR1ΔDDK-GR の転写活性化能を誘導しないときのマイクロアレイ解析のシグナル強度に比べて、誘導したときのシグナル強度が 1.5 倍以上に増加した遺伝子を考察-表 1 に列記した。その中には、本研究によって ARR1 のダイレクトターゲット遺伝子として同定したタイプ A *ARR* 遺伝子である *ARR5*、*ARR6*、*ARR7*、Putative glutaredoxin 遺伝子、Putative disease resistance response 遺伝子 (At4g11190) が含まれていた。このことは、マイクロアレイ解析結果の正当性を支持するものであると考えられ、さらなる ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子の存在を期待させるものである。考察-図 1 に示したスキャッタープロットから、本研究で行ったマイクロアレイ解析における遺伝子の転写量の変化の程度が Rashotte らの研究で行われたマイクロアレイ解析(Rashotte et al., 2003)における WT 植物体にサイトカイニン付加したときの遺伝子の転写量の変化よりも小さいように思われた (data not shown)。このような結果が得られた理由の 1 つとして、BA が根から植物体へ吸収されて効果を発揮するよりも DEX が根から吸収されて植物体で効果を発揮するほうが時間を必要としている可能性が考えられる。本研究で行ったノザンプロット解析において傾向として WT 植物体への BA 付加による遺伝子の転写産物量の増加は 1 時間処理と 3 時間処理のどちらの場合でも明瞭に観察されるが、DEX 付加による ARR1ΔDDK-GR DEX の転写活性化能の誘導では 1 時間処理よりも 3 時間処理で顕著な差が認められる。これらのことから DEX 付加後の処理時間を 1 時間よりも長時間行ったときの遺伝子の転写産物量の変化を解析することが、マイクロアレイ解析によって ARR1 ダイレクトターゲット候補遺伝子探索するときの最良の条件であると考えられる。

興味深いことに HiCEP 解析およびマイクロアレイ解析において ARR1ΔDDK-GR の転写活性化能の誘導により転写産物量の減少がみられる遺伝子の候補が確認された(考察表 2)。しかし、そのような遺伝子の解析は本研究では行っていない。サイトカニンによって転写産物量の減少がみられる遺伝子がいくつか報告されているが(Che et al., 2002; Hoth et al., 2003; Rashotte et al., 2003; Brenner et al., 2005)、ARR1 や他のタイプ B ARR によって直接転写が抑制される遺伝子については報告がないので今後さらなる解析が必要であろう。

3. ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーター解析

本研究において ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーターに含まれる ARR1 の *in vitro* での結合配列である 5'-GAT(T/C)-3' の近傍の配列の解析を行った。その結果、その 5' 上流に AA、3' 上流に TT の配列の出現頻度が高いことが明らかとなった。それらの配列の一つである 5'-GATCTT-3' がサイトカニン応答遺伝子の 5' 上流に高頻度で存在することが示されている(Rashotte et al., 2003)。5' や 3' の付加的な配列は ARR1 の *in vitro* における DNA への結合にどのように影響するかは分からないが、植物個体において ARR1 の DNA への結合安定性に関わっている可能性が考えられる。また他の可能性として、ARR1 と相互作用してこれらの配列に結合するタンパク質が存在するのかも知れない。また、両端に付加的な配列をもつ 5'-AAGAT(T/C)TT-3' は、パリンドローム構造もしくは擬似的なパリンドローム構造をしており、ARR1 がホモダイマーもしくは他のタイプ B ARR とのヘテロダイマーを形成し、DNA に結合している可能性が示唆される。

ARR1 と類似した DNA 結合ドメインを有する GARP ファミリー転写因子である CCA1 は、アラビドプシスにおいて概日リズムの調整を行っている。この CCA1 は *CAB1/Lhcb1*3* 遺伝子 (At1g29930) のプロモーターに存在する 5'-AAAAATCT-3' および 5'-AACAATCT-3' と *in vitro* で結合することが示されているが(Wang et al., 1997)、5'-AAAAATCT-3' の相補配列である 5'-AGATTTT-3' は、ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーターに高頻度で出現する 5'-AAGAT(T/C)TT-3' と類似している。このことは GARP ファミリー転写因子群が類似した DNA 配列を認識していることを示唆している。しかし本研究では、ARR1ΔDDK-GR の転写活性化能の誘導によって *CAB1/Lhcb1*3* 遺伝子の転写量は上昇しなかった。このことから、5'-AAGAT(T/C)TT-3' 以外にも *cis* エlement として必要な構造が存在するのかも知れない。

4. *ARR6* 遺伝子のプロモーターに対する *ARR1* の DNA 結合ドメインの結合様式の解析

本研究では大腸菌で発現させた *ARR1* の DNA 結合ドメイン (*GST-ARR1DBD*) を用いて *ARR6* 遺伝子プロモーターのどのような配列に結合しているのかを調べた。ゲルシフトアッセイを行ったいくつかの *ARR6* 遺伝子のプロモーター断片に対して、*ARR1* の *in vitro* での結合配列である 5'-GAT(T/C)-3' を基本配列とした 5'-AAGATT-3'、5'-GATTTT-3'、5'-AAGATTTT-3' のいずれかの配列を含む DNA 断片に結合することが示された。また、約 220bp の *ARR6* プロモーター断片を用いて行った DNaseI フットプリントにより、少なくともゲルシフトアッセイで強い結合の確認されたいくつかの DNA 断片に存在する 5'-AAGATTTT-3' や 5'-GATTTT-3' を含む配列に選択的に結合していることが示された。これらのことは本研究で行った *ARR1* ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーターに高頻度に出現する 5'-AAGATT-3'、5'-GATTTT-3'、5'-AAGATTTT-3' の配列が *ARR1* によって特異的に認識されている可能性を支持するものである。本研究の結果のみではまだ *ARR1* 認識配列を決定することは出来ないで、さらなる *ARR1* ダイレクトターゲット遺伝子のプロモーターを用いた DNaseI フットプリント解析による情報の蓄積が期待される。

本研究の結論と今後の展望

本研究の結果から、シロイヌナズナのサイトカイニンシグナル伝達に関する 2 つの重要な事象が明らかとなった。第一に、ほとんどの場合において初発応答遺伝子が *ARR1* ダイレクトターゲットであったということから、サイトカイニン受容から初発応答遺伝子の転写活性化への主要な経路がタイプ B *ARR* への His-Asp リン酸リレーであることが示唆された。第二に、*ARR1* ダイレクトターゲット遺伝子は広範囲な制御機能を持ったタンパク質をコードしていることが明らかとなった。このことは、サイトカイニンシグナル伝達経路が His-Asp リン酸リレーを介して *ARR1* の転写活性化能を調節し、多様性に富んだ *ARR1* ターゲット遺伝子の転写量を上昇させて植物個体の様々なサイトカイニン応答現象を制御していることを示している。これらの 2 つの事象は、*ARR1* や他のタイプ B *ARR* が植物体の様々なサイトカイニン応答現象に通ずるシグナル経路における中心的存在であることを示している。

一方、ターゲットプロモーターに存在する必須構造については、さらなる研究の余地が残っている。例えば、本研究で行った *ARR1* の DNA 結合ドメインタンパク質を用いて行ったゲルシフトアッセイや、DNaseI フットプリントによって *ARR6* プロモーター以外のプロモーターを多数解析することによってその結合様式情報を集積することが必要であると考えられる。また、新規のタンパク質合成なしに *ARR1ΔDDK-GR* の転写

活性化能を誘導することで転写産物量の変化する遺伝子をマイクロアレイ解析によって抽出し、それらのプロモーター構造解析を行うことも有効な手段であると考えられる。今後プロモーター解析の情報の蓄積により詳細な必須構造が明らかになると共に、ARR1のダイレクトターゲット遺伝子がプロモーターのDNA配列情報から抽出できるようになることが期待される。

考察表 1 マイクロアレイ解析によって検出された *35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換植物への DEX 付加したときに転写発現に変化が見られる遺伝子 (転写発現増加)

MIPS accession	Affymetrix no.	Remarks	FC ^a
At1g52890	260203_at	NAM-like protein	3.7
At3g48100*	252374_at	response reactor 2 (ARR5)	3.1
At5g59820	247655_at	zinc finger protein Zat12	2.9
At1g74930	262211_at	AP2 domain containing protein	2.9
At5g61600	247543_at	DNA binding protein (EREBP-4)	2.9
At1g73540	245777_at	unknown protein	2.8
At4g24570	254120_at	putative mitochondrial uncoupling protein	2.7
At1g27730	261648_at	salt-tolerance zinc finger protein	2.7
At5g51190	248448_at	putative ethylene responsive element binding factor	2.5
At3g44260	252679_at	CCR4-associated factor 1-like	2.4
At1g60190	264217_at	hypothetical protein	2.4
At5g17350	250098_at	putative protein	2.3
At2g23170	245076_at	unknown protein	2.2
At3g16857	256790_at	ARR1 protein	2.1
At1g07840	261419_at	hypothetical protein	2.1
At4g27657	253859_at	Expressed protein	2.1
At3g61190	251336_at	putative protein	2.1
At4g27654	253832_at	Expressed protein	2.1
At4g09950	255003_at	ALG1-like protein	2.0
At2g35980	263948_at	similar to harpin-induced protein hin1 from tobacco	2.0
At2g40000	267357_at	putative nematode-resistance protein	2.0
At4g27652	253830_at	Expressed protein	2.0
At1g68620	262229_at	unknown protein	1.9
At4g27410	253872_at	putative protein Arabidopsis thaliana nap gene	1.9
At1g15010	260744_at	hypothetical protein	1.9
At4g27280	253915_at	putative protein	1.8
At2g38240	267147_at	putative anthocyanidin synthase	1.8
At3g23770	257170_at	beta-1,3-glucanase	1.8
At3g25790	257645_at	unknown protein	1.8
At1g64590	261956_at	oxidoreductase	1.8
At5g42330	249249_at	unknown protein	1.8
At3g09860	258654_at	unknown protein	1.8
At5g16420	250115_at	salt-inducible protein-like	1.8
At3g04640	258792_at	hypothetical protein	1.8
At5g42600	249205_at	cycloartenol synthase	1.8
At3g46620	252474_at	putative protein	1.8
At4g37370	253046_at	cytochrome P450	1.7
At5g22250	249928_at	CCR4-associated factor-like	1.7
At3g59900	251436_at	putative protein	1.7
At5g14650	250142_at	polygalacturonase	1.7
At3g30720	256940_at	unknown protein	1.7
At5g22410	249934_at	peroxidase ATP14a homolog	1.7
At1g69350	260348_at	PPR-repeat protein	1.7
At2g44430	267386_at	unknown protein	1.7
At5g51290	248450_at	putative protein	1.7
At1g19050*	259466_at	response regulator 5 (ARR7)	1.7
At5g48410	248701_at	ligand-gated ion channel protein	1.7
At1g16530	262704_at	hypothetical protein	1.7
At1g32840	263254_x_at	hypothetical protein	1.7
At1g80060	262067_at	hypothetical protein	1.7

考察-表 1 (続き)

MIPS accession	Affymetrix no.	Remarks	FC ^a
At1g52180	259837_at	aquaporin	1.7
At3g62930*	251195_at	glutaredoxin-like protein	1.7
At1g23340	263042_at	conserved hypothetical protein	1.7
At3g45070	252605_s_at	sulfotransferase-like protein FLAVONOL 4	1.6
At3g57160	251660_at	Expressed protein	1.6
At2g46660	266321_at	putative cytochrome P450	1.6
At5g43890	249094_at	dimethylaniline monooxygenase-like	1.6
At4g22480	254315_at	putative glycine-rich protein	1.6
At4g01910	255546_at	putative CHP-rich zinc finger protein	1.6
At1g51890	246368_at	light repressible receptor protein kinase	1.6
At5g22310	249887_at	putative protein	1.6
At1g66400	260135_at	calmodulin-related protein	1.6
At3g14760	256599_at	hypothetical protein	1.6
At2g02450	266175_at	NAM-like protein	1.6
At2g15350	263560_s_at	unknown protein	1.6
At5g63905	247305_at	Expressed protein	1.6
At3g50060	252193_at	R2R3-MYB transcription factor	1.6
At1g49450	262448_at	En/Spm-like transposon protein	1.6
At1g76650	259879_at	putative calmodulin	1.6
At4g17750	245379_at	heat shock transcription factor HSF1	1.6
At4g00640	255687_at	hypothetical protein	1.6
At5g67390	246997_at	putative protein	1.6
At5g53010	248290_at	Ca ²⁺ -transporting ATPase-like protein	1.6
At1g52550	262127_at	hypothetical protein	1.6
At3g03700	259345_s_at	hypothetical protein	1.6
At5g06320	250676_at	harpin-induced protein	1.6
At5g47330	248812_at	palmitoyl-protein thioesterase precursor	1.6
At4g11190*	254907_at	putative disease resistance response protein	1.6
At1g66500	256356_s_at	hypothetical protein	1.6
At4g36670	246238_at	sugar transporter like protein	1.6
At1g26540	261000_at	hypothetical protein predicted by genemark.hmm	1.6
At1g08340	261809_at	rac GTPase activating protein	1.6
At1g61670	264429_at	hypothetical protein	1.6
At1g77400	246387_at	hypothetical protein	1.6
At3g19030	256891_at	hypothetical protein	1.6
At4g28150	253813_at	putative protein	1.6
At1g32840	261235_x_at	hypothetical protein	1.6
At3g60720	251381_at	secretory protein	1.6
At1g66100	256527_at	thionin	1.6
At4g38440	252990_at	putative protein	1.6
A3tg28590	256990_at	hypothetical protein	1.6
At4g16890	245451_at	disease resistance RPP5 like	1.6
At4g37770	253066_at	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase-like	1.6
At5g62920*	247406_at	response regulator 6 (ARR6)	1.6
At5g12870	250322_at	putative transcription factor (MYB46)	1.6
At5g55900	248035_at	sucrose cleavage protein-like	1.6
At4g08330	255134_at	putative protein	1.5
At3g50850	252187_at	putative protein UV inducible protein UV122	1.5
At4g24110	254200_at	putative protein	1.5
At2g26530	245041_at	AR781, similar to yeast pheromone receptor	1.5
At1g63740	260269_at	putative disease resistance protein	1.5
At3g49750	252248_at	putative protein resistance gene Hcr2-5B	1.5
At1g23710	265184_at	unknown protein	1.5
At2g22930	266828_at	putative flavonol 3-O-glucosyltransferase	1.5

考察-表 1 (続き)

MIPS accession	Affymetrix no.	Remarks	FC ^a
At1g65870	261914_at	dirigent protein	1.5
At1g07430	261077_at	protein phosphatase 2C	1.5
At3g15720	258252_at	putative polygalacturonase	1.5
At5g63130	247393_at	unknown protein	1.5
At4g16470	245498_at	hypothetical protein	1.5
At3g47210	252458_at	putative protein	1.5
At3g21710	257946_at	hypothetical protein	1.5
At1g71910	260171_at	hypothetical protein	1.5
At3g14340	258356_at	unknown protein	1.5
At5g02690	251003_at	putative protein	1.5
At1g18740	261405_at	unknown protein	1.5
At3g06100	256398_at	putative major intrinsic protein	1.5
At5g01470	251092_at	putative protein	1.5

^a DEX 付加時の mRNA のマイクロアレイ解析におけるシグナル強度を DEX 未付加時の強度で割った値が 1.5 以上のものを示している。

* 本研究において ARR1 ダイレクトターゲット遺伝子として同定した遺伝子を示している。

考察-表 2 マイクロアレイ解析によって検出された *35S-ARR1DDDK-GR* 形質転換植物への DEX 付加したときに転写発現に変化が見られる遺伝子 (転写発現減少)

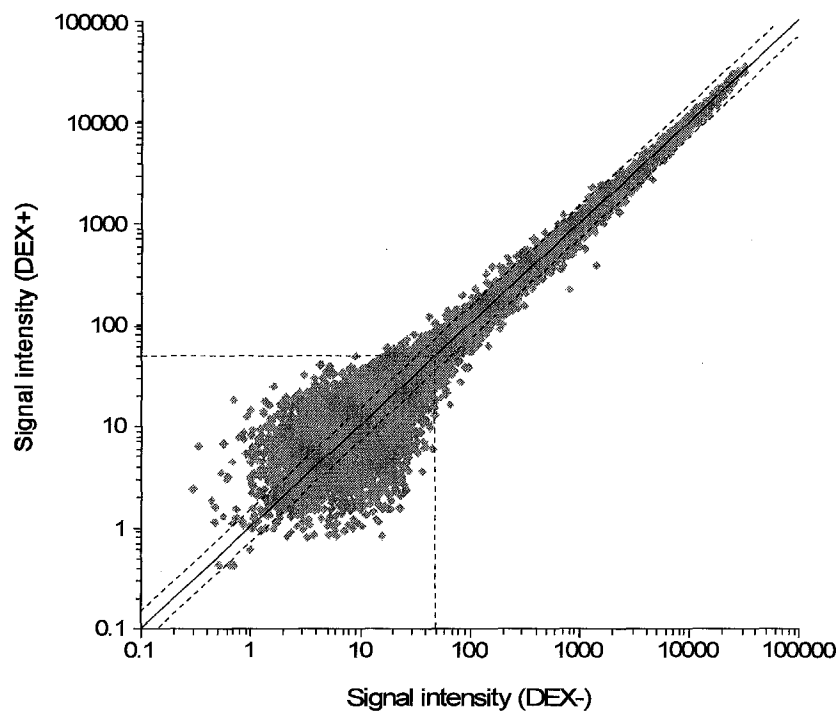
MIPS Accession	Affymetrix no.	Descriptions	FC
At1g61800	264400_at	glucose-6-phosphate/phosphate-translocator precursor	3.4
At2g14610	266385_at	Pathogenesis-related PR-1-like	2.9
At5g57760	247878_at	unknown protein	2.4
At1g19630	261134_at	cytochrome P450	2.2
At2g44460	267389_at	putative beta-glucosidase	1.9
At2g26020	257365_x_at	putative antifungal protein	1.9
At2g21590	263544_at	putative ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit	1.9
At4g20420	254465_at	tapetum-specific A3 like	1.9
At3g57260	251625_at	beta-1,3-glucanase 2 (BG2, PR-2)	1.8
At3g05370	259298_at	putative disease resistance protein	1.8
At1g73010	262369_at	Hypothetical protein	1.7
At4g39210	252888_at	glucose-1-phosphate adenyltransferase (APL3)	1.7
At5g17220	250083_at	glutathione S-transferase-like	1.7
At4g24010	254186_at	putative protein cellulose synthase catalytic subunit (Ath-A)	1.7
At3g15670	258224_at	LEA76 homologue type2	1.7
At4g23140	254265_s_at	serine threonine kinase - like	1.7
At3g02040	258856_at	Hypothetical protein	1.7
At3g27150	256750_at	unknown protein	1.7
At5g20790	246001_at	putative protein	1.6
At5g54060	248185_at	flavonol 3-O-glucosyltransferase-like	1.6
At5g42800	249215_at	dihydroflavonol 4-reductase	1.6
At4g14090	245624_at	glucosyltransferase like protein	1.6
At5g19460	246038_s_at	putative protein thiamin pyrophosphokinase	1.6
At4g15210	245275_at	beta-amylase	1.6
At4g28710	253793_at	myosin heavy chain - like	1.6
At2g23680	267288_at	similar to cold acclimation protein WCOR413	1.6
At1g17450	261034_s_at	Hypothetical protein	1.6
At1g03495	265091_s_at	Hypothetical protein	1.6
At5g66350	247093_at	zinc finger protein SHI-like	1.6
At5g09470	245882_at	mitochondrial carrier-like	1.6
At5g44820	254521_at	putative protein	1.6
At3g11370	259260_at	unknown protein similar	1.6
At4g14150	245259_at	kinesin like	1.6
At5g56780	247974_at	putative protein	1.6
At4g13290	254767_s_at	cytochrome p450 - like	1.6
At3g13784	256779_at	beta-fructofuranosidase	1.6
At5g48850	248676_at	putative protein	1.6
At3g16360	259329_at	putative two-component phosphorelay mediator (AHP4)	1.6
At1g80130	262050_at	unknown protein	1.6
At5g17270	250087_at	putative protein	1.6
At4g38600	252948_at	putative protein NLS receptor	1.6
At1g73120	262373_at	Hypothetical protein	1.5
At5g52740	248321_at	putative protein	1.5
At1g70270	264341_at	Hypothetical protein	1.5
At5g60880	247599_at	putative protein	1.5
At5g59360	247715_at	putative protein	1.5
At5g08565	250537_at	Expressed protein	1.5
At2g37060	265466_at	putative CCAAT-box binding transcription factor	1.5
At5g15070	246551_at	putative protein	1.5
At3g08860	258983_at	putative aminotransferase	1.5
At5g44420	249052_at	antifungal protein-like (PDF1.2)	1.5
At2g07707	265230_s_at	Hypothetical protein	1.5

考察表 2 (続き)

MIPS Accession	Affymetrix no.	Descriptions	FC
At2g21850	257432_at	unknown protein	1.5
At4g16940	245457_s_at	disease resistance RPP5 like protein	1.5
At4g13980	245283_at	Expressed protein	1.5
At1g26330	245869_at	Hypothetical protein	1.5
--- ^b	244903_at	Hypothetical protein	1.5
At2g18500	265951_at	Hypothetical protein	1.5
At4g24240	254159_at	putative DNA-binding protein	1.5
At2g35170	266518_at	Hypothetical protein	1.5
At1g20720	256082_at	Hypothetical protein	1.5
At5g42140	249225_at	TMV resistance protein-like	1.5
At3g05660	258893_at	putative disease resistance protein	1.5

^a DEX 未付加時の mRNA のマイクロアレイ解析におけるシグナル強度を DEX 付加時の強度で割った値が 1.5 以上のものを示している。

^b MIPS accetion の存在しない遺伝子を示している。



考察-図 1 *ARR1ΔDDK-GR* の転写活性化能誘導に伴う遺伝子転写産物量変化を調べるために行ったマイクロアレイ解析結果のスクアッタープロット

35S-ARR1ΔDDK-GR 形質転換体への DEX 付加による *ARR1* の転写活性化能誘導に伴う遺伝子転写産物量変化を調べるためにマイクロアレイ解析を行った。アレイ解析には、*35S-ARR1ΔDDK-GR* 形質転換体に DEX 付加を行うものを行わないものを設け、薬剤付加後 1 時間の mRNA を調製して用いた。この図は、マイクロアレイ解析の結果をスクアッタープロットにして示したものである。図の縦軸は DEX 付加時の mRNA のマイクロアレイ解析におけるシグナル強度を示しており、横軸は DEX 未付加時の強度を示している。水平および垂直の破線は DEX 付加および未付加時のシグナル強度 50 のしきい値の境界線を示している。また、斜めの 2 本破線は DEX 付加時と未付加時のシグナル強度を比較したときに 1.5 倍以上のしきい値の境界線を示している。

謝辞

本研究を行うにあたり、素晴らしい環境とテーマを与えてくださり丁寧にご指導くださいました京都大学化学研究所の岡穆宏教授、青山卓史助教授、柘植知彦助手に深く御礼申し上げます。同研究室にてお世話くださいました技官の安田敬子さん、用務の高橋廣子さん、秘書の寺本日出美さん、その他岡研究室のスタッフの皆様、諸先輩方々、後輩学生の皆様に感謝いたします。

また、HiCEP 解析を行うにあたり共同研究を行って下さった、日清紡研究開発センター佐々木直一様にお礼申し上げます。

生活全般、いやそれ以上をサポートしてくれた妻と、長期に渡って様々な援助をしてくれた両親に感謝いたします。

参考文献

- Anantharaman, V., and Aravind, L. (2001). The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem Sci* **26**, 579-582.
- Aoyama, T., and Oka, A. (2003). Cytokinin signal transduction in plant cells. *J Plant Res* **116**, 221-231.
- Brandstatter, I., and Kieber, J.J. (1998). Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1009-1019.
- Brenner, W.G., Romanov, G.A., Kollmer, I., Burkle, L., and Schmulling, T. (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant J* **44**, 314-333.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R.L. (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plant*. (American Society of Plant Physiology).
- Che, P., Gingerich, D.J., Lall, S., and Howell, S.H. (2002). Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 2771-2785.
- Crowell, D.N., and Amashino, R.M. (1994). Cytokinins and Plant Gene Regulation. In *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*, D.W.S. Mok and M.C. Mok, eds (Boca Raton: CRC Press), pp. 233-242.
- D'Agostino, I.B., Deruere, J., and Kieber, J.J. (2000). Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol* **124**, 1706-1717.
- Dortay, H., Mehnert, N., Burkle, L., Schmulling, T., and Heyl, A. (2006). Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Febs J* **273**, 4631-4644.
- Ferreira, F.J., and Kieber, J.J. (2005). Cytokinin signaling. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 518-525.
- Flores, S., and Tobin, E.M. (1986). Benzyladenine modulation of the expression two genes for nuclear-encoded chloroplast proteins in *Lemna gibba*: Apparent post-transcriptional regulation. *Planta* **168**, 340-349.
- Fosket, D.E. (1994). *Plant Growth and Development: A Molecular Approach*.

(Academic Press).

- Fukumura, R., Takahashi, H., Saito, T., Tsutsumi, Y., Fujimori, A., Sato, S., Tatsumi, K., Araki, R., and Abe, M. (2003). A sensitive transcriptome analysis method that can detect unknown transcripts. *Nucleic Acids Res* 31, e94.
- Gang, D.R., Costa, M.A., Fujita, M., Dinkova-Kostova, A.T., Wang, H.B., Burlat, V., Martin, W., Sarkanen, S., Davin, L.B., and Lewis, N.G. (1999). Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. *Chem Biol* 6, 143-151.
- Hejatko, J., Pernisova, M., Eneva, T., Palme, K., and Brzobohaty, B. (2003). The putative sensor histidine kinase CKI1 is involved in female gametophyte development in *Arabidopsis*. *Mol Genet Genomics* 269, 443-453.
- Hemerly, A.S., Ferreira, P., de Almeida Engler, J., Van Montagu, M., Engler, G., and Inze, D. (1993). *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* 5, 1711-1723.
- Heyl, A., and Schmulling, T. (2003). Cytokinin signal perception and transduction. *Curr Opin Plant Biol* 6, 480-488.
- Higuchi, M., Pischke, M.S., Mahonen, A.P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S., Helariutta, Y., Sussman, M.R., and Kakimoto, T. (2004). In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8821-8826.
- Hosoda, K., Imamura, A., Katoh, E., Hatta, T., Tachiki, M., Yamada, H., Mizuno, T., and Yamazaki, T. (2002). Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the *Arabidopsis* response regulators. *Plant Cell* 14, 2015-2029.
- Hoth, S., Ikeda, Y., Morgante, M., Wang, X., Zuo, J., Hanafey, M.K., Gaasterland, T., Tingey, S.V., and Chua, N.H. (2003). Monitoring genome-wide changes in gene expression in response to endogenous cytokinin reveals targets in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 554, 373-380.
- Hutchison, C.E., and Kieber, J.J. (2002). Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14 Suppl, S47-59.
- Hutchison, C.E., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M.W., Maxwell, B.B., Perdue, T.D., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Kieber, J.J. (2006). The *Arabidopsis* Histidine Phosphotransfer Proteins Are Redundant Positive Regulators of Cytokinin Signaling. *Plant Cell*.
- Hwang, I., and Sheen, J. (2001). Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413, 383-389.

- Imamura, A., Yoshino, Y., and Mizuno, T. (2001). Cellular localization of the signaling components of Arabidopsis His-to-Asp phosphorelay. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**, 2113-2117.
- Imamura, A., Kiba, T., Tajima, Y., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2003). In vivo and in vitro characterization of the ARR11 response regulator implicated in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **44**, 122-131.
- Imamura, A., Hanaki, N., Umeda, H., Nakamura, A., Suzuki, T., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (1998). Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2691-2696.
- Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M., Kiba, T., Ueguchi, C., Sugiyama, T., and Mizuno, T. (1999). Compilation and characterization of Arabidopsis thaliana response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiol* **40**, 733-742.
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., and Kakimoto, T. (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature* **409**, 1060-1063.
- Kakimoto, T. (1996). CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* **274**, 982-985.
- Kakimoto, T. (2003). Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 605-627.
- Kiba, T., Aoki, K., Sakakibara, H., and Mizuno, T. (2004). Arabidopsis response regulator, ARR22, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the wol cytokinin-receptor mutant. *Plant Cell Physiol* **45**, 1063-1077.
- Kiba, T., Taniguchi, M., Imamura, A., Ueguchi, C., Mizuno, T., and Sugiyama, T. (1999). Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **40**, 767-771.
- Kiba, T., Naitou, T., Koizumi, N., Yamashino, T., Sakakibara, H., and Mizuno, T. (2005). Combinatorial microarray analysis revealing arabidopsis genes implicated in cytokinin responses through the His->Asp Phosphorelay circuitry. *Plant Cell Physiol* **46**, 339-355.
- Kiba, T., Yamada, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2003). The type-A response regulator, ARR15, acts as a negative regulator in the cytokinin-mediated signal transduction in Arabidopsis thaliana. *Plant*

Cell Physiol 44, 868-874.

- Lohrmann, J., Sweere, U., Zabaleta, E., Baurle, I., Keitel, C., Kozma-Bognar, L., Brennicke, A., Schafer, E., Kudla, J., and Harter, K. (2001). The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in Arabidopsis. *Mol Genet Genomics* 265, 2-13.
- Mahonen, A.P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N., and Helariutta, Y. (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root. *Genes Dev* 14, 2938-2943.
- Mason, M.G., Mathews, D.E., Argyros, D.A., Maxwell, B.B., Kieber, J.J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Schaller, G.E. (2005). Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 3007-3018.
- Miller, C.O. (1961). A Kinetin-Like Compound in Maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47, 170-174.
- Miller, C.O., Skoog, F., Von Saltza, M.H., and Strong, F.M. (1955). KINETIN, A CELL DIVISION FACTOR FROM DEOXYRIBONUCREIC ACID. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1392.
- Miyata, S., Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1998). Characterization of genes for two-component phosphorelay mediators with a single HPT domain in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett* 437, 11-14.
- Mizuno, T. (2005). Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants: from hormone responses to circadian rhythms. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 2263-2276.
- Mok, M.C. (1994). Cytokinin and plant development - An overview. In *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*, D.W.S. Mok and M.C. Mok, eds (Boca Raton: CRC Press), pp. 155-166.
- Mougel, C., and Zhulin, I.B. (2001). CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem Sci* 26, 582-584.
- Nishimura, C., Ohashi, Y., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Ueguchi, C. (2004). Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 1365-1377.
- Ohgishi, M., Oka, A., Morelli, G., Ruberti, I., and Aoyama, T. (2001). Negative autoregulation of the Arabidopsis homeobox gene ATHB-2. *Plant J* 25,

389-398.

- Oka, A., Sakai, H., and Iwakoshi, S. (2002). His-Asp phosphorelay signal transduction in higher plants: receptors and response regulators for cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet Syst* **77**, 383-391.
- Pas, J., von Grotthuss, M., Wyrwicz, L.S., Rychlewski, L., and Barciszewski, J. (2004). Structure prediction, evolution and ligand interaction of CHASE domain. *FEBS Lett* **576**, 287-290.
- Picard, D. (1994). Regulation of protein function through expression of chimaeric proteins. *Curr Opin Biotechnol* **5**, 511-515.
- Picard, D., Salser, S.J., and Yamamoto, K.R. (1988). A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell* **54**, 1073-1080.
- Rashotte, A.M., Carson, S.D., To, J.P., and Kieber, J.J. (2003). Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **132**, 1998-2011.
- Rashotte, A.M., Mason, M.G., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E., and Kieber, J.J. (2006). A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11081-11085.
- Reski, R. (1994). Plastid Genes and Chloroplast Biogenesis. In *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*, D.W.S. Mok and M.C. Mok, eds (Boca Raton: CRC Press), pp. 179-195.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., and Yu, G. (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**, 2105-2110.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacqmard, A., and Murray, J.A. (1999). Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**, 1541-1544.
- Romanov, G.A., Lomin, S.N., and Schmulling, T. (2006). Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J Exp Bot*.
- Rupp, H.M., Frank, M., Werner, T., Strnad, M., and Schmulling, T. (1999). Increased steady state mRNA levels of the STM and KNAT1 homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J* **18**, 557-563.

- Sablowski, R.W., and Meyerowitz, E.M. (1998). A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell* **92**, 93-103.
- Sakai, H., Aoyama, T., and Oka, A. (2000). Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J* **24**, 703-711.
- Sakai, H., Aoyama, T., Bono, H., and Oka, A. (1998). Two-component response regulators from Arabidopsis thaliana contain a putative DNA-binding motif. *Plant Cell Physiol* **39**, 1232-1239.
- Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Oka, A. (2001). ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science* **294**, 1519-1521.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F., and Coupland, G. (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science* **288**, 1613-1616.
- Schmulling, T., Schafer, S., and Romanov, G. (1997). Cytokinins as regulators of gene expression. *Physiologia Plantarum* **100**, 505-519.
- Soni, R., Carmichael, J.P., Shah, Z.H., and Murray, J.A. (1995). A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* **7**, 85-103.
- Suzuki, T., Imamura, A., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (1998). Histidine-containing phosphotransfer (HPt) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **39**, 1258-1268.
- Suzuki, T., Ishikawa, K., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2002). An Arabidopsis histidine-containing phosphotransfer (HPt) factor implicated in phosphorelay signal transduction: overexpression of AHP2 in plants results in hypersensitiveness to cytokinin. *Plant Cell Physiol* **43**, 123-129.
- Suzuki, T., Sakurai, K., Imamura, A., Nakamura, A., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (2000). Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of Arabidopsis thaliana. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 2486-2489.
- Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H., and Mizuno, T. (2001). The Arabidopsis sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol* **42**, 107-113.
- Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira-Rodado, V., Baurle, I., Kudla, J.,

- Nagy, F., Schafer, E., and Harter, K. (2001). Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* **294**, 1108-1111.
- Takei, K., Yamaya, T., and Sakakibara, H. (2004). Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin. *J Biol Chem* **279**, 41866-41872.
- Tanaka, Y., Suzuki, T., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2004). Comparative studies of the AHP histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in Arabidopsis thaliana. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 462-465.
- Taniguchi, M., Kiba, T., Sakakibara, H., Ueguchi, C., Mizuno, T., and Sugiyama, T. (1998). Expression of Arabidopsis response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *FEBS Lett* **429**, 259-262.
- Tantikanjana, T., Mikkelsen, M.D., Hussain, M., Halkier, B.A., and Sundaresan, V. (2004). Functional analysis of the tandem-duplicated P450 genes SPS/BUS/CYP79F1 and CYP79F2 in glucosinolate biosynthesis and plant development by Ds transposition-generated double mutants. *Plant Physiol* **135**, 840-848.
- Tian, Q., and Reed, J.W. (1999). Control of auxin-regulated root development by the Arabidopsis thaliana SHY2/IAA3 gene. *Development* **126**, 711-721.
- To, J.P., Haberer, G., Ferreira, F.J., Deruere, J., Mason, M.G., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Kieber, J.J. (2004). Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **16**, 658-671.
- Ueguchi, C., Koizumi, H., Suzuki, T., and Mizuno, T. (2001a). Novel family of sensor histidine kinase genes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **42**, 231-235.
- Ueguchi, C., Sato, S., Kato, T., and Tabata, S. (2001b). The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **42**, 751-755.
- Urao, T., Miyata, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2000). Possible His to Asp phosphorelay signaling in an Arabidopsis two-component system. *FEBS Lett* **478**, 227-232.
- Wagner, D., Sablowski, R.W., and Meyerowitz, E.M. (1999). Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science* **285**, 582-584.
- Wang, Z.Y., Kenigsbuch, D., Sun, L., Harel, E., Ong, M.S., and Tobin, E.M. (1997). A

- Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an Arabidopsis Lhcb gene. *Plant Cell* **9**, 491-507.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., and Schmulling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10487-10492.
- Yamada, H., Koizumi, N., Nakamichi, N., Kiba, T., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2004). Rapid response of Arabidopsis T87 cultured cells to cytokinin through His-to-Asp phosphorelay signal transduction. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 1966-1976.
- Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2001). The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol* **42**, 1017-1023.